

RECEIVED

18 MAR 2004

17 MAY 2005

PCT/JP03/14538

14.11.03

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月26日

出願番号
Application Number: 特願2002-342683

[ST. 10/C]: [JP2002-342683]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構

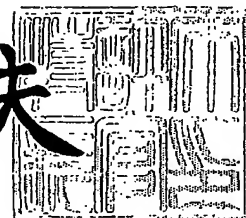
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 3月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3105057

【書類名】 特許願

【整理番号】 A031P90

【提出日】 平成14年11月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/15

【発明者】

 【住所又は居所】 福岡県福岡市早良区高取 2 - 1 5 - 1 6

 【氏名】 福井 宣規

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都渋谷区西原 1 - 4 8 - 1 - 1 0 8

 【氏名】 笹月 健彦

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

 【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 044347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0013099

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リンパ球遊走に不可欠な DOCK2 の機能ドメイン及び会合分子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 DOCK2 と ELMO と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 と ELMO との会合形成の程度を評価することを特徴とする DOCK2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項2】 DOCK2 の SH3 ドメインと ELMO と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 の SH3 ドメインと ELMO との会合形成の程度を評価することを特徴とする DOCK2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項3】 DOCK2 と ELMO の C 末端領域と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 と ELMO の C 末端領域との会合形成の程度を評価することを特徴とする DOCK2 と ELMO の C 末端領域との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項4】 DOCK2 の SH3 ドメインと ELMO の C 末端領域と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 の SH3 ドメインと ELMO の C 末端領域との会合形成の程度を評価することを特徴とする DOCK2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項5】 DOCK2 若しくはその SH3 ドメイン及び／又は ELMO 若しくはその C 末端領域が、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグと結合していることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の DOCK2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項6】 DOCK2 若しくはその SH3 ドメインに対する抗体又は DOCK2 若しくはその SH3 ドメインと融合した他のペプチドに対する抗体により分画された DOCK2 若しくはその SH3 ドメインに、ELMO 若しくはその C 末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の DOCK2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 7】 GTP 結合型の活性型 Rac を検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 8】 DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 9】 DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質が、DOCK 2 と ELMO との結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 10】 ELMO が、ELMO 1 であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 11】 請求項 1～10 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法。

【請求項 12】 請求項 1～10 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする Rac を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法。

【請求項 13】 ELMO と GDP/GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 14】 ELMO の N 末端領域と GDP/GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで ELMO の N 末端領域と GDP/GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする ELMO と GDP/GTP 交換因子と

の会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 15】 E L M O 若しくはその N 末端領域及び／又は G D P / G T P 交換因子が、他のペプチドと融合していることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 16】 G D P / G T P 交換因子に対する抗体又は G D P / G T P 交換因子と融合した他のペプチドに対する抗体により分画された G D P / G T P 交換因子に、E L M O 若しくはその N 末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 13 ～ 15 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 17】 G T P 結合型の活性型 R a c を検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 13 ～ 16 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 18】 E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項 13 ～ 17 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 19】 E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質が、E L M O と G D P / G T P 交換因子との結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項 13 ～ 17 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 20】 E L M O が、D O C K 2 と結合した E L M O であることを特徴とする請求項 13 ～ 19 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 21】 E L M O が、E L M O 1 であることを特徴とする請求項 13 ～ 20 のいずれか記載の E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 22】 G D P / G T P 交換因子が、R a c 特異的な G D P / G T P 交換因子であることを特徴とする請求項 13 ～ 21 のいずれか記載の E L M O

と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 23】 Rac 特異的な GDP/GTP 交換因子が Tiam1 であることを特徴とする請求項 22 記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

【請求項 24】 請求項 13～23 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GVH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法。

【請求項 25】 請求項 13～23 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする Rac を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法。

【請求項 26】 DOCK2 と ELMO と GDP/GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 と ELMO との会合形成の程度、あるいは、ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 27】 DOCK2 の SH3 ドメインと ELMO と GDP/GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 の SH3 ドメインと ELMO との会合形成の程度、あるいは、ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 28】 GTP 結合型の活性型 Rac を検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 26 又は 27 記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 29】 ELMO が、DOCK2 と結合した ELMO であることを特徴とする請求項 26～28 のいずれか記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 30】 ELMO が、ELMO1 であることを特徴とする請求項 26～29 のいずれか記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング

方法。

【請求項 3 1】 GDP/GTP 交換因子が、Rac 特異的な GDP/GTP 交換因子であることを特徴とする請求項 26～30 のいずれか記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 3 2】 Rac 特異的な GDP/GTP 交換因子が Tiam1 であることを特徴とする請求項 3 1 記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 3 3】 請求項 26～32 のいずれか記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質の探索方法。

【請求項 3 4】 請求項 26～32 のいずれか記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法。

【請求項 3 5】 請求項 26～32 のいずれか記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする Rac を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法。

【請求項 3 6】 請求項 1 1、2 4 又は 3 4 記載の探索方法により得られることを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬。

【請求項 3 7】 請求項 1 2、2 5 又は 3 5 記載の探索方法により得られることを特徴とする Rac を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬。

【請求項 3 8】 SH3 ドメインを含む DOCK2 の N 末端領域を標的とし、DOCK2 の SH3 ドメインと該 SH3 ドメイン結合タンパク質と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 と SH3 ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価することを特徴とする DOCK2 機能阻害物質のスクリーニング方法。

。

【請求項 39】 完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これらの細胞株におけるRac活性化の程度を測定・評価し、DOCK2の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイン会合分子を探索し、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、欠失変異体を用いたDOCK2機能ドメインの同定や、DOCK2及びDOCK2のSH3ドメインとの結合を干渉する物質のスクリーニング、とりわけDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMOとTiam等のGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用するアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

免疫応答は、生体にとって感染に対する必須の防御機構であり、免疫細胞は、種々の感染源に迅速に対処すべく生体内を常にパトロールしている。このように構成細胞が絶えず動き回るという特徴は、他の生命複雑系においては認められず、免疫系独自に進化したものである。免疫細胞のうち、好中球、マクロファージといった細胞は感染の初期防御において機能する一方、Tリンパ球及びBリンパ球はその抗原受容体を介して外来異物を認識することで抗原特異的な免疫応答を引き起こすことが知られている。上記T及びBリンパ球は、胸腺、骨髄といった1次リンパ組織で分化し、脾臓、リンパ節、パイエル板（小腸のリンパ組織）といった2次リンパ組織の特定のコンパートメントへ移動した後、ここで、種々の組織から集められた抗原を、かかる抗原受容体を介して認識することにより特異

的な免疫応答を惹起する。この際、リンパ球が2次リンパ組織の特定の部位に移動することは、免疫応答の成立において極めて重要である。これまで、リンパ球の移動が、種々のケモカインと総称されるタンパク質によって導かれることは知られているが、リンパ球の運動性そのものを制御する分子機構に関しては不明であった。

【0003】

細胞運動には、細胞極性の変化と細胞骨格の再構築が必須であり（例えば、非特許文献1参照。）、これらはいずれもRho、Rac、Cdc42といった低分子量Gタンパク質によって制御されていることが知られている（例えば、非特許文献2～5参照。）。この中でもとりわけRacは、葉状突起と呼ばれるアクチンに富んだ突起を形成することで細胞運動の際の駆動力を提供している（例えば、非特許文献3、6参照。）。他方、線虫（*Caenorhabditis elegans*）、ヒト及びショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）において、CED5、DOCK180、Myoblast city（MBC）という構造上相同性を示す分子が同定され、これらの分子はその頭文字をとってCDMファミリー分子と呼ばれており、いずれもRacの上流で機能することで細胞骨格の再構築に関与すると考えられている（例えば、非特許文献7～12参照。）。上記CED-5及びMyoblast Cityが特定タイプの細胞の運動に重要であることが突然変異体を用いた遺伝学的解析から明らかになっているが（例えば、非特許文献8、9、12参照。）、CDMファミリータンパク質が、哺乳類において生理的にどのように機能するかは未だ不明であった。

【0004】

DOCK2（KIAA0209；DNA Res. 3, 321-329）は、ヒト造血細胞で特異的に発現するCDMファミリータンパク質の他のメンバーをコードし、上記DOCK2が293T腎細胞においてRacに結合し、Racを活性化することが知られている（例えば、非特許文献13参照。）。一方、本発明者らは、マウス胸腺cDNAライブラリーよりCDMファミリーに属する新規遺伝子Hchを単離し、かかる遺伝子産物が1828のアミノ酸から成り、そのN末端にはSH3ドメインがコードされていることを見い出した（例えば、非特許文献14参照

。)。また、マウス組織を用いたノーザンブロット解析において、DOCK180がさまざまな臓器に発現しているのに対して、Hc hの発現は胸腺及び脾臓に限局していることや、細胞株を用いた解析より2種類の変異T細胞株を除いて、Hc hの発現がT細胞、B細胞、マクロファージのいずれにおいても認められることを確認した。またHc hの発現を欠く変異T細胞株にHc hを導入することで細胞形態の著明な変化と接着性の亢進が観察されることを明らかにしている。Hc hのコードする1828アミノ酸のうち1677アミノ酸はヒトDOCK2と同一であり、Hc hはマウスDOCK2ホモログと考えられたが、上記DOCK2の生理的機能は不明であった。

【0005】

本発明者らは、上記のようにCDMファミリーに属し、且つリンパ球特異的に発現する分子としてDOCK2を同定し、ノックアウトマウスを作製することで、この分子がリンパ球遊走に不可欠であることを明らかにした（例えば、非特許文献14参照。）。DOCK2欠損リンパ球では種々のケモカイン刺激によっても活性型Racは検出できない。それ故、DOCK2はRacの活性化を介してリンパ球遊走を制御していると考えられる。しかしながら、DOCK2がどのような機序でRacを活性化するのか依然として不明である。Racは分子スイッチとして機能し、GDP/GTP交換因子（GEF）により活性化される。DOCK2はRacと結合するものの、その構造上GEFとして機能するとは考えにくい。それ故、DOCK2は他の分子を介してGEFをリクルートすることによりRacを活性化していると推測される。

【0006】

最近、線虫において、CDMファミリー分子の一種であるCED-5と会合し、細胞骨格を制御する分子であるCED-12が同定され、その哺乳類ホモログとしてELMO1, 2, 3が報告された（例えば、非特許文献15参照。）。また、GDP/GTP交換因子（GEF）としてこれまでに数10種類のものが知られており、これらGEFの中でも、Rac特異的なGEFとして機能する分子として、胸腺腫細胞株の浸潤を規定するTiam1, 2（例えば、非特許文献16、17参照。）や、T細胞受容体シグナルを制御するVav1（例えば、非特

許文献 1 8 参照。) の他 V a v 2、V a v 3 や、T r i o (例えば、非特許文献 1 9 参照。) や、S T E F (例えば、非特許文献 2 0 参照。) や、P - R e x 1 (例えば、非特許文献 2 1 参照。) が知られており、これら 5 種類はいずれも共通のドメインをもっており、G T P を R a c に付与する機能を有している。

【0 0 0 7】

【非特許文献 1】

Cell 84, 359-369, 1996

【非特許文献 2】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5027-5031, 1995

【非特許文献 3】

Science 279, 509-514 1998

【非特許文献 4】

J. Cell Biol. 141, 1147-1157, 1998

【非特許文献 5】

Science 287, 1037-1040, 2000

【非特許文献 6】

Cell 103, 227-238, 2000

【非特許文献 7】

Mol. Cell Biol. 16, 1770-1776, 1996

【非特許文献 8】

J. Cell Biol. 138, 589-603, 1997

【非特許文献 9】

Nature 392, 501-504, 1998

【非特許文献 1 0】

Genes Dev. 12, 3331-3336, 1998

【非特許文献 1 1】

Genes Dev. 12, 3337-3342, 1998

【非特許文献 1 2】

Nature Cell Biol. 2, 131-136, 2000

【非特許文献 1 3】

Biochem. Biophys. Acta 1452, 179-187, 1999

【非特許文献 1 4】

Nature, 412, 826-831, 2001

【非特許文献 1 5】

Cell, 107, 27-41, 2001

【非特許文献 1 6】

Cell, 77, 537-549, 1994

【非特許文献 1 7】

Nature, 375, 338-340, 1995

【非特許文献 1 8】

Nature, 385, 169-172, 1997

【非特許文献 1 9】

J. Cell Science, 113, 729-739, 2000

【非特許文献 2 0】

J. Biol. Chem., 277, 2860-2868, 2002

【非特許文献 2 1】

Cell, 108, 809-821, 2002

【0 0 0 8】

【発明が解決しようとする課題】

自己免疫疾患や移植片拒絶は、標的組織にリンパ球が浸潤することによりもたらされる。そのため、これらの疾患や病態を治療あるいは予防する上で、DOCK 2 は格好の標的分子になると考えられる。本発明の課題は、欠失変異体を用いた DOCK 2 機能ドメインの同定や、DOCK 2 及び DOCK 2 の SH3 ドメインとの結合を干渉する物質のスクリーニング、とりわけ DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMO と T i a m 等の G E F との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用するアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等等を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

DOCK2はN末端のSH3ドメインを含む1828アミノ酸残基からなるリンパ球特異的に発現する分子であり、Racを活性化し、細胞骨格を制御することでリンパ球の運動性を規定している。本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、DOCK2のSH3ドメインを含むN末端の504アミノ酸残基を欠失したDOCK2変異体ではRac活性化能が著しく低下し、アクチン重合を惹起できないことを見出し、この領域に結合する分子としてELMO1を同定した。また、SH3ドメインの1アミノ酸変異により、DOCK2とELMO1との結合が完全に阻害されることから、DOCK2はSH3ドメインを介してELMO1に会合していることを見出した。さらに、ELMO1が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子（GEF）として機能するTiam1と結合することを見出した。すなわち、DOCK2はELMO1を介してTiam1をリクルートすることによりRacを活性化していることを見出した。したがって、DOCK2のSH3ドメイン、ELMO1、Tiam1という分子間相互作用を阻害することで、リンパ球遊走を人為的に制御しうることを見出した。本発明は、以上の知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0010】

すなわち本発明は、DOCK2とELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOとの会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項1）や、DOCK2のSH3ドメインとELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOとの会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項2）や、DOCK2とELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOのC末端領域との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項3）や、DOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域と

の会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項4）や、DOCK2若しくはそのSH3ドメイン及び／又はELMO若しくはそのC末端領域が、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグと結合していることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項5）や、DOCK2若しくはそのSH3ドメインに対する抗体又はDOCK2若しくはそのSH3ドメインと融合した他のペプチドに対する抗体により分画されたDOCK2若しくはそのSH3ドメインに、ELMO若しくはそのC末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項6）や、GTP結合型の活性型Racを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項7）や、DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項8）や、DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質が、DOCK2とELMOとの結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項9）や、ELMOが、ELMO1であることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項10）や、請求項1～10のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GVH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法（請求項11）や、請求項1～10のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするRacを活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法（請求項12）に関する。

【0011】

また本発明は、ELMOとGDP/GTP交換因子と被検物質とを接触させ、次いでELMOとGDP/GTP交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項13）や、ELMOのN末端領域とGDP/GTP交換因子と被検物質とを接触させ、次いでELMOのN末端領域とGDP/GTP交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項14）や、ELMO若しくはそのN末端領域及び／又はGDP/GTP交換因子が、他のペプチドと融合していることを特徴とする請求項13又は14記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項15）や、GDP/GTP交換因子に対する抗体又はGDP/GTP交換因子と融合した他のペプチドに対する抗体により分画されたGDP/GTP交換因子に、ELMO若しくはそのN末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項13～15のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項16）や、GTP結合型の活性型Racを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項13～16のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項17）や、ELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項13～17のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項18）や、ELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質が、ELMOとGDP/GTP交換因子との結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項13～17のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項19）や、ELMOが、DOCK2と結合したELMOであることを特徴とする請求項13～19のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項20）や、ELMOが、ELMO1であることを特徴とする請求項13～20のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子と

の会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項 21）や、GDP/GTP 交換因子が、Rac 特異的な GDP/GTP 交換因子であることを特徴とする請求項 13～21 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項 22）や、Rac 特異的な GDP/GTP 交換因子が Tiam1 であることを特徴とする請求項 22 記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項 23）や、請求項 13～23 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法（請求項 24）や、請求項 13～23 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする Rac を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法（請求項 25）に関する。

【0012】

さらに本発明は、DOCK2 と ELMO と GDP/GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 と ELMO との会合形成の程度、あるいは、ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 26）や、DOCK2 の SH3 ドメインと ELMO と GDP/GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 の SH3 ドメインと ELMO との会合形成の程度、あるいは、ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 27）や、GTP 結合型の活性型 Rac を検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 26 又は 27 記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 28）や、ELMO が、DOCK2 と結合した ELMO であることを特徴とする請求項 26～28 のいずれか記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 29）や、ELMO が、ELMO1 であることを特徴とする請求項 26～29 のいずれか記載の Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 30）や

、GDP/GTP交換因子が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子であることを特徴とする請求項26～30のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項31）や、Rac特異的なGDP/GTP交換因子がTiam1であることを特徴とする請求項31記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項32）や、請求項26～32のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質の探索方法（請求項33）や、請求項26～32のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法（請求項34）や、請求項26～32のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするRacを活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法（請求項35）や、請求項11、24又は34記載の探索方法により得られることを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬（請求項36）や、請求項12、25又は35記載の探索方法により得られることを特徴とするRacを活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬（請求項37）や、SH3ドメインを含むDOCK2のN末端領域を標的とし、DOCK2のSH3ドメインと該SH3ドメイン結合タンパク質と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とSH3ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法（請求項38）や、完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これらの細胞株におけるRac活性化の程度を測定・評価し、DOCK2の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイン会合分子を探索し、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法（請求項39）に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法としては、DOCK2とELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOとの会合形成の程度を評価する方法や、DOCK2のSH3ドメインとELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOとの会合形成の程度を評価する方法や、DOCK2とELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価する方法や、DOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価する方法であれば、特に制限されるものではなく、上記、DOCK2若しくはそのSH3ドメイン及び／又はELMO若しくはそのC末端領域として、これらとマーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合した融合タンパク質又は融合ペプチドとして用いてもよい。また、上記ELMOとしては、ELMO1、ELMO2、ELMO3を具体的に挙げることができるが、中でもELMO1を好適に例示することができる。

【0014】

上記DOCK2のSH3ドメインとしては、ELMOと会合しうる機能を有するDOCK2の変異体で、DOCK2のSH3ドメインの全部又は一部を含むペプチドを例示することができ、具体的には、DOCK2の1位から502位のアミノ酸残基からなるDOCK2Nや、DOCK2の1位から1311位のアミノ酸残基からなるDOCK2ΔCを挙げるができる。また、上記ELMOのC末端領域としては、DOCK2のSH3ドメインと会合しうる機能を有するELMOの変異体で、ELMOのC末端領域の全部又は一部を含むペプチドを例示することができ、具体的には、ELMO1の147位から727位のアミノ酸残基からなるELMO1-del1や、ELMO1の345位から727位のアミノ酸残基からなるELMO1-del8を挙げるができる。以下、DOCK2と上記DOCK2のSH3ドメインを合わせて「DOCK2等」、ELMO1などのELMOと上記ELMOのC末端領域を合わせて「ELMO等」ということ

がある。

【0015】

上記DOCK2変異体やELMO変異体は、DOCK2遺伝子やELMO遺伝子を常法により改変することにより調製することができる。DOCK2遺伝子としては、Hch（マウスDOCK2）遺伝子（GenBankアクセッションナンバーAY027438；Nature, Vol412, 23 August, 826-831, 2001）、ヒトDOCK2遺伝子（XM_047961；DNA Res. 3, 321-329）を具体的に挙げることができるが、DOCK2遺伝子の由来はマウス及びヒト等に限られるものではない。また、ELMO1などのELMO遺伝子としては、マウスELMO1遺伝子（AF398883；Cell, Vol.107 (1), 27-41, 2001）、ヒトELMO1遺伝子（AF398885；Cell, Vol.107 (1), 27-41, 2001）の他、ELMO2遺伝子（ヒトAF398886、マウスAF398884）、ELMO3遺伝子（ヒトNM_024712）を具体的に挙げることができるが、DOCK2遺伝子やELMO遺伝子の由来はマウス及びヒト等に限られるものではない。なお、マウスDOCK2のアミノ酸配列については配列番号1に、ヒトDOCK2のアミノ酸配列については配列番号2に、マウスELMO1のアミノ酸配列については配列番号3に、ヒトELMO1のアミノ酸配列については配列番号4に示す。

【0016】

上記DOCK2等やELMO等と、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合している融合タンパク質や融合ペプチドにおける、マーカートンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、またペプチドタグとしては、HA、FLAG、Myc等のエピトープタグや、GST、マルトース結合タンパク質、ビオチン化ペプチド、オリゴヒスチジン等の親和性タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質や融合ペプチドは、常法により作製することができ、HAタグに対する特異抗体を利用して、DOCK2等やELMO1等とHAタグとの融合タンパク質や融合ペプチドを分離

・分画することができる。

【0017】

DOCK2とELMO1などのELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、DOCK2等とELMO等と被検物質とを接触させる方法としては、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を評価することができる接触方法であれば特に制限されるものではなく、セルフリー系で被検物質の存在下、DOCK2等とELMO等とを接触させる方法や、DOCK2等発現細胞に、ELMO等やELMO等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターを被検物質と共に導入する方法や、ELMO等発現細胞に、DOCK2等やDOCK2等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターを被検物質と共に導入する方法や、DOCK2等・ELMO等非発現細胞に、DOCK2等やDOCK2等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターと、ELMO等やELMO等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターと、被検物質とを導入する方法を挙げることができる。

【0018】

上記被検物質との接触のために用いられる細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真核細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowsメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げることができるが、動物細胞が好ましい。また、かかる細胞内にDOCK2等やELMO等を導入する方法としては、上記の遺伝子を導入する方法の他に、巨大分子と非共有結合体を形成し、タンパク質等の巨大分子の構造を変化させ、タンパク質等の巨大分子を細胞内にデリバリーすることができるChariot（Active Motif社製）等の細胞毒性のない試薬を用いることもできる。

【0019】

また、上記発現ベクターとしては、動物細胞用発現ベクターが好ましく、かか

る動物細胞用発現ベクターとしては、例えば、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。また、動物細胞用発現ベクターに代えてリポソームを用いることもできる。そして、かかる動物細胞用発現ベクターの細胞への導入は、Davisら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及びSambrookら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレップローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。

【0020】

本発明のDOCK2とELMO1などのELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を評価する方法としては、分離・分画されたDOCK2等にELMO等に対する抗体を作用させ、あるいは、分離・分画されたELMO等にDOCK2等に対する抗体を作用させ、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を免疫化学的に測定・評価する方法を挙げることができ、DOCK2等やELMO等を分離・分画するには、DOCK2等やELMO等に対する特異抗体、タグ特異的抗体を用いることができる。また、タンパク質-タンパク質間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく検出できる酵母のtwo hybrid systemや、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することができる表面プラズ

モン共鳴現象を利用したバイオセンサーや、立体構造の変化を検出できるNMR法を使用して、その会合形成の程度を測定・評価する方法を挙げることができる。その他、大腸菌発現系を用いたfar western法、アフィニティークロマトグラフィーを利用する方法等の公知の相互作用するタンパク質の探索法を好適に例示することができる。

【0021】

本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を評価するもう一つの方法として、GTP結合型の活性型Racを検出する評価方法を挙げることができる。活性型Racの検出には、PAK1 Rac結合ドメインのGST融合タンパク質を用いたプルダウン法を用いることができる。

【0022】

本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法における被検試料としては、例えばペプチド、タンパク質、合成化合物、微生物発酵物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物又は動物細胞抽出物あるいはそれらのライブラリーを挙げることができる。また、本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、コントロール実験を併用することができる。コントロールとしては、DOCK2等とELMO等との会合形成に影響を及ぼすことのないネガティブコントロール、及び／又はDOCK2等とELMO等との会合形成に影響を及ぼすポジティブコントロールを用いることができる。

【0023】

上記DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質としては、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質、特にDOCK2とELMOとの結合を阻害する物質等のリンパ球遊走制御機能の抑制物質を挙げることができる。リンパ球遊走制御機能としては、DOCK2遺伝子の発現に依拠するリンパ球の運動性を制御する機能であれば特に制限されるものではないが、Racを活性化してRac-GTP結合体とし、細胞骨格の再構築、特にリンパ球におけるアクチン重合を促進する機能や、SLC、SDF-1、BLC等のケモカイン刺激によるリンパ球の

遊走機能や、脾臓、リンパ節、パイエル板等の2次リンパ組織へのホーミング機能や、ELCケモカイン刺激に対する成熟胸腺T細胞の末梢血中への移出機能や、SDF-1ケモカイン刺激に対するCD4+CD8+未熟胸腺細胞の遊走機能等を具体的に例示することができる。

【0024】

本発明はまた、ELMOとGDP/GTP交換因子(GEF)との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法に関する。ELMOとGEFとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法としては、ELMOとGEFと被検物質とを接触させ、次いでELMOとGEFとの会合形成の程度を評価する方法や、ELMOのN末端領域とGEFと被検物質とを接触させ、次いでELMOのN末端領域とGEFとの会合形成の程度を評価する方法であれば特に制限されるものではなく、また、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法としては、DOCK2とELMOとGEFと被検物質とを接触させ、あるいは、DOCK2のSH3ドメインとELMOとGEFと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOとの会合形成の程度、あるいは、ELMOとGEFとの会合形成の程度を評価する方法であれば特に制限されるものではなく、上記ELMOとして、DOCK2と結合したELMOを用いることもできる。

【0025】

上記ELMOとしては、ELMO1、ELMO2、ELMO3を具体的に挙げるができるが、中でもELMO1を好適に例示することができるが、また、上記GEFとしては、Tiam1、Tiam2、Vav1、Vav2、Vav3、Trio、STEF、P-Rex1などのRac特異的なGDP/GTP交換因子が好ましく、中でもTiam1を好適に例示することができる。上記Tiam1遺伝子としては、マウスTiam1遺伝子(NM_009384; Cell, Vol.77(4), 537-549, 1994)、ヒトTiam1遺伝子(NM_003253; Oncogene Vol. 10(7), 1371-1376, 1995)を具体的に挙げるができるが、Tiam1遺伝子の由来はマウス及びヒト等に限られるものではない。なお、マウスTiam1のアミノ酸配列を配列番号5に、ヒトTiam1のアミノ酸配列を配列番

号6に示す。

【0026】

上記ELMOとGEFとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法における、ELMOとGEFとの会合形成の程度を評価する方法、DOCK2とELMOとの会合形成の程度を評価する方法、他のペプチドと融合しているELMO又はそのN末端領域やGEFを用いる方法などを含め、前記DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法における手法を準用することができる。

【0027】

以上の本発明のDOCK2とELMO1などELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMOとGEFとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法、特にリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用すると、DOCK2を標的としたアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する予防・治療薬のスクリーニングが可能となる。例えば、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られる抗DOCK2 SH3ドメイン抗体、DOCK2 SH3ドメイン結合分子（低分子化合物を含む）、DOCK2遺伝子のアンチセンス鎖、ELMO1などELMOのC末端領域のDOCK2 SH3ドメイン結合部位を特異的に認識する抗体、ELMO1などELMOのC末端領域のDOCK2 SH3ドメイン結合部位に結合する分子（低分子化合物を含む）、ELMO1などELMOのN末端領域のTiam1などGEF結合部位を特異的に認識する抗体、ELMO1などELMOのN末端領域のTiam1などGEF結合部位に結合する分子（低分子化合物を含む）、ELMO1などELMOのアンチセンス鎖等のリンパ球遊走制御機能の抑制物質は、リンパ球の運動性を人為的に抑制しうることが期待されることから、アレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬となりうる可能性がきわめて大きい。かかる治療薬を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配

合成分を添加することができ、通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる。

【0028】

また、本発明のDOCK2とELMO1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMO1とTiam1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法、特にリンパ球遊走制御機能の促進物質のスクリーニング方法を利用すると、Racを活性化して細胞骨格の再構築を促進しうることから、リンパ球遊走抑制に起因する疾病、例えば、各種癌や、薬剤・放射線照射によって引き起こされる免疫不全症などに対する予防・治療薬のスクリーニングが可能となる。

【0029】

さらに、本発明のDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法としては、SH3ドメインを含むDOCK2のN末端領域を標的とし、DOCK2のSH3ドメインと該SH3ドメイン結合タンパク質と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とSH3ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価する方法や、完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これらの細胞株におけるRac活性化の程度を測定・評価し、DOCK2の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイン会合分子を探索し、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価する方法を挙げることができ、被検物質と接触させる方法や会合形成の程度を評価する方法やRac活性化の程度を測定方法などは、上述した方法を用いることができ、DOCK2の機能ドメインの同定方法や完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株の作製は以下の実施例記載の方法を用いることができる。

【0030】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1 (DOCK 2 の N 末端の領域と E L M O 1 との結合)

線虫において最近 C E D - 5 と会合し、細胞骨格を制御する分子として C E D - 1 2 が同定され、その哺乳類ホモログとして E L M O 1 が報告された (非特許文献 1 5)。そこで、DOCK 2 と E L M O 1 とが結合するか否かを検討するために、PcDNA/His maxベクター (Invitrogen社製) を用いて C 末端に H A タグ (Y P Y D V P D Y A : 配列番号 7) を挿入した完全長 DOCK 2 あるいは種々の DOCK 2 欠失変異体をコードする遺伝子コンストラクト (P c D N A

DOCK 2 - H A、P c D N A DOCK 2 N - H A、P c D N A DOCK 2 Δ C - H A、P c D N A DOCK 2 Δ N - H A) を構築し、PcDNA V5-His ベクター (Invitrogen社) に E L M O 1 c D N A を挿入した遺伝子 (P c D N A E L M O 1 - V 5) と共に 2 9 3 T 細胞 (九州大学畠山鎮次博士より分与) に遺伝子導入した。DOCK 2 コンストラクトは本発明者らが単離した遺伝子 (非特許文献 1 4) より、E L M O 1 コンストラクトはマウス組織 c D N A より P C R 法を用いて常法により作製した。使用した DOCK 2 欠失変異体をコードする遺伝子は以下の通りであり、これを図 1 A に模式的に示す。

- 1) P c D N A DOCK 2 N - H A ; DOCK 2 の 1 位から 5 0 2 位のアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 2) P c D N A DOCK 2 Δ C - H A ; DOCK 2 の 1 位から 1 3 1 1 位のアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 3) P c D N A DOCK 2 Δ N - H A ; DOCK 2 の 5 0 5 位から 1 8 2 8 位のアミノ酸残基をコードする遺伝子

【 0 0 3 1 】

遺伝子導入後 4 8 時間で細胞を回収し、Lysis buffer (Cell signaling社製) で溶解した後、total cell lysate 及び抗 H A 抗体 (Roche社製) による免疫沈降物を対象に抗 V 5 抗体 (Invistorgen社製) を用いたウェスタンブロット法にて解析した。total cell lysate ではいずれも抗 V 5 抗体で E L M O 1 に相当する約 1 0 0 K D のバンドが検出された (図 1 B ; 上段)。しかしながら、免疫沈降

物においては、完全長DOCK2、DOCK2 Δ C、DOCK2 Nをコードする遺伝子を導入した場合ELMO1に相当するバンドが認められたが、DOCK2のN末端504位までのアミノ酸残基を欠くDOCK2 Δ Nを発現させた場合は検出できなかった(図1B;中段下段)。このことから、DOCK2はそのN末端の502個のアミノ酸残基の領域でELMO1と会合することが明らかとなった。

【0032】

実施例2 (N末端領域を欠失したDOCK2 Δ NでのRacの活性化)

ELMO1との会合がDOCK2の機能にどのような影響を及ぼすかを検討するため、PBJ1ベクターを用いて完全長DOCK2及びDOCK2のN末端504アミノ酸残基を欠失した変異体(DOCK2 Δ N)をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、これらをDOCK2遺伝子の発現を欠くT細胞株BE α 16-3 (National Jewish CenterのPhilippa Marrack博士より分与)に導入した安定遺伝子導入細胞株を樹立した。N3-5はDOCK2を発現する野生型T細胞株であり、17-11 (非特許文献14)及び84-3は本発明者らが樹立した、それぞれ完全長DOCK2あるいはDOCK2 Δ Nを発現する遺伝子導入細胞株である。本発明者らが作製した抗DOCK2ポリクロナール抗体を用いたウェスタンブロット解析において、17-11と84-3におけるDOCK2及びDOCK2 Δ Nの発現はほぼ同程度であった(図2A、参考写真1参照。)。そこで17-11と84-3を対象に、これらの細胞株におけるRac活性化をPAK1 Rac結合ドメインのGST融合タンパク質を用いたプルダウン法にて比較解析した。完全長DOCK2を発現する17-11においてはGTP結合型の活性型Racが容易に検出できたが、ELMO1との結合部位を欠くDOCK2 Δ Nを発現する84-3ではRac活性化能が顕著に低下していた(図2B、参考写真1参照。)。17-11と84-3をPI (propidium iodide) で核染色したところ、親株であるBE α 16-3と異なり、いずれにおいても核が偏在する一すなわち細胞の極性化が起こっているという所見が得られた(図2C;上段、参考写真1参照。)。しかしながら、これらの細胞をF-アクチンのプローブであるファロイジンで染色した場合、アクチン重合は17-11においてのみ認め

られ、84-3ではDOCK2の発現を欠くBE α 16-3と同様全く検出されなかった(図2C;下段、参考写真1参照。)。このことから、DOCK2とELMO1との会合はRacのfull activationにも、それに伴う細胞骨格の再構築にも極めて重要であることが示唆された。以上のことから、ELMO1との結合に重要なN末端領域を欠失したDOCK2 Δ NではRac活性化能が顕著に低下し、アクチン重合を誘導できないことがわかった。

【0033】

実施例3 (DOCK2のSH3ドメインを介してのELMO1との会合)

DOCK2はN末端にはタンパク質-タンパク質相互作用に関与することが知られているSH (Src-homology) 3ドメインがコードされている。DOCK2のN末端の502個のアミノ酸残基がELMO1との会合に重要であることを見出したので、これがSH3ドメインを介したものであるのかどうかにつき検討を加えた。SH3ドメインには共通して保存されたアミノ酸残基が存在している。そこで、PcDNA/His max ベクターを用いてC末端にHAタグを挿入した種々のDOCK2 SH3変異体をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、PcDNA ELMO1-V5と共に293T細胞に遺伝子導入することで図1Bと同様に解析した。DOCK2 SH3変異体をコードする遺伝子は以下のとおりである。

- 1) PcDNA L27E-HA; DOCK2の27位のロイシンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子
- 2) PcDNA G32E-HA; DOCK2の32位のグリシンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子
- 3) PcDNA P60E-HA; DOCK2の60位のプロリンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子
- 4) PcDNA F63E-HA; DOCK2の63位のフェニルアラニンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子

【0034】

DOCK2 SH3ドメインを含む10位から89位までのアミノ酸配列を図3Aに示す。total cell lysateにおいてはいずれも抗V5抗体でELMO1に

相当する約100KDのバンドが検出された(図3B;上段)。しかしながら抗HA抗体を用いた免疫沈降物を対象とした場合、ELMO1に相当するバンドはPcDNA DOCK2-HA及びPcDNA L27E-HAを導入した以外では検出できなかった(図3B;中段)。一方、いずれの遺伝子を導入した場合でもDOCK2及びDOCK2 SH3変異体の発現は同程度であった(図3B;下段)。以上の結果は、SH3ドメインの1アミノ酸置換でDOCK2とELMO1との会合が完全に阻害されることを示すものであり、これらのことから、DOCK2はそのSH3ドメインを介してELMO1に結合していることが明らかとなった。

【0035】

実施例4 (ELMO1のC末端領域とDOCK2との結合)

次にDOCK2と結合するELMO1の機能ドメインを同定するため、PcDNA V5Hisベクターを用いて、種々のELMO1欠失変異体をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、PcDNA DOCK2-HAと共に293T細胞に遺伝子導入することで解析した。ここで使用したELMO1欠失変異体をコードする遺伝子は以下の通りであり、これを図4Aに模式的に示す。

- 1) PcDNA ELMO1-del1-V5; ELMO1の147位から727位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 2) PcDNA ELMO1-del8-V5; ELMO1の345位から727位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 3) PcDNA ELMO1-del110-V5; ELMO1の1位から613位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子

【0036】

total cell lysate においてはいずれも抗V5抗体でELMO1もしくはその欠失変異体に相当するバンドが検出された(図4B;上段)。しかしながら、抗HA抗体による免疫沈降物においては、抗V5抗体に反応するバンドは完全長ELMO1、ELMO1-del1及びELMO1-del8をコードする遺伝子を導入した場合には認められるものの、ELMO1の614位から727位までのアミノ酸残基を欠くPcDNA ELMO1-del110を発現させた場合は

検出できなかった(図4B;中段、下段)。このことから、ELMO1の614位から727位までのアミノ酸残基を含むC末端の領域がDOCK2 SH3ドメインとの会合に重要であることが示された。これらのことから、ELMO1はそのC末端の領域でDOCK2に結合していることがわかった。

【0037】

実施例5 (ELMO1のN末端領域とTiam1との結合)

Tiam1は胸腺腫細胞株の浸潤を規定する分子として同定されたものであり、Rac特異的なGDP/GTP交換因子(GEF)として機能することが知られている(Cell 77, 537-549, 1994、Nature375, 338-340, 1995)。DOCK2とELMO1との会合がRacのfull activationに必要であることから、DOCK2はELMO1を介してTiam1をリクルートしているという可能性が考えられた。この仮説を検証するために、マウス組織cDNAよりPCR法を用いて増幅したTiam1遺伝子を基に、PCIベクター(Promega社製)を用いて、C末端にHAタグを挿入したTiam1をコードするコンストラクト(PCI Tiam1-HA)を構築し、完全長ELMOあるいは種々のELMO1欠失変異体をコードする遺伝子(PcDNA ELMO1-V5、PcDNA ELMO1-de1PH-V5、PcDNA ELMO1-de18-V5、PcDNA ELMO1-de11)と共に293T細胞に遺伝子導入し解析した。PcDNA

ELMO1-de1PH-V5はELMO1の1位から565位までと695位から727位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子であり、ここで使用したELMO1欠失変異体を図5Aに模式的に示す。total cell lysateにおいてはいずれも抗V5抗体でELMO1もしくはその欠失変異体に相当するバンドが検出された(図5B;上段)。抗HA抗体による免疫沈降物においてもPcDNA

ELMO1-V5及びPcDNA ELMO1-de1PH-V5を導入した場合、抗V5抗体に反応するバンドが検出された(図5B;中段、下段)。このことは、Tiam1とELMO1とが結合するということを示している。しかしながら、ELMO1のN末端の146位まであるいは344位までのアミノ酸残基を欠失させた変異体ではこのような結合は認められず(図5B;中段、下段)、これらのことから、ELMO1はそのN末端でTiam1と会合していること

が示された。

【0038】

以上より、1) DOCK2はSH3ドメインを介してELMO1のC末端の領域に結合すること、2) ELMO1はそのN末端の領域を介してTiam1と結合すること、3) ELMO1と結合できないDOCK2変異体ではRac活性化能が著しく低下することが明らかとなった。このことから、DOCK2はELMO1を介して、RacのGEFとして機能するTiam1をリクルートすることによりRacを活性化していることが示された(図6)。

【0039】

自己免疫疾患や移植片拒絶は、標的組織にリンパ球が浸潤することによって惹起されるため、これら疾患や病態を治療あるいは予防する上でDOCK2シグナル伝達は格好の標的となる。今回の知見は、DOCK2、ELMO1、Tiam1という分子間相互作用が細胞運動に不可欠なRac活性化を制御しているということを示すものであり、これらの分子間相互作用を遮断することでリンパ球浸潤を阻止し得るものと考えられる。それ故、これら分子間相互作用は自己免疫疾患や移植片拒絶の治療法や予防法の開発に向け今後の創薬の標的になるものと期待される。

【0040】

【発明の効果】

本発明によれば、DOCK2の分子間相互作用を解明し、DOCK2を標的としたリンパ球遊走制御物質及びリンパ球遊走制御方法を提供することができる。また、本発明によれば、DOCK2の分子間相互作用を阻害することによる、自己免疫疾患や移植片拒絶反応の予防薬又は治療薬を提供することができる。

【0041】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> The functional domain and its associated molecule of DOCK2 which i

s essential for lymphocyte migration

<130> A031P90

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1828

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Ala Pro Trp Arg Lys Thr Asp Lys Glu Arg His Gly Val Ala Ile

1

5

10

15

Tyr Asn Phe Gln Gly Ser Glu Ala Gln His Leu Thr Leu Gln Ile Gly

20

25

30

Asp Val Val Arg Ile Gln Glu Thr Cys Gly Asp Trp Tyr Arg Gly Tyr

35

40

45

Leu Ile Lys His Lys Leu Ser Gln Gly Ile Phe Pro Thr Ser Phe Ile

50

55

60

His Leu Lys Glu Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Asn Ile Glu Asn Ile
65 70 75 80

Ile Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ala Gln Glu Val Thr Thr Thr Leu Trp
85 90 95

Glu Trp Gly Ser Ile Trp Lys Gln Leu Tyr Val Ala Ser Lys Lys Glu
100 105 110

Arg Phe Leu Gln Val Gln Ser Met Met Tyr Asp Leu Met Glu Trp Arg
115 120 125

Ser Gln Leu Leu Ser Gly Thr Leu Pro Lys Asp Glu Leu Lys Glu Leu
130 135 140

Lys Gln Lys Val Thr Ser Lys Ile Asp Tyr Gly Asn Lys Ile Leu Glu
145 150 155 160

Leu Asp Leu Ile Val Arg Asp Glu Asp Gly Asn Ile Leu Asp Pro Asp
165 170 175

Lys Thr Ser Val Ile Ser Leu Phe His Ala His Glu Glu Ala Thr Tyr
180 185 190

Lys Ile Thr Glu Arg Ile Lys Glu Glu Met Ser Lys Asp Gln Pro Asp
195 200 205

Tyr Gly Val Tyr Ser Arg Ile Ser Ser Ser Pro Thr His Ser Leu Tyr
210 215 220

Val Phe Val Arg Asn Phe Val Cys Arg Ile Gly Glu Asp Ala Glu Leu
225 230 235 240

Phe Met Ser Leu Tyr Asp Pro His Lys Gln Thr Val Ile Ser Glu Asn
245 250 255

Tyr Leu Val Arg Trp Gly Ser Lys Gly Phe Pro Lys Glu Ile Glu Met
260 265 270

Leu Asn Asn Leu Lys Val Val Phe Thr Asp Leu Gly Asn Lys Asp Leu
275 280 285

Asn Arg Asp Lys Ile Phe Leu Ile Cys Gln Ile Val Arg Ile Gly Lys
290 295 300

Met Asp Leu Lys Asp Ile Asn Ala Lys Lys Cys Thr Gln Gly Leu Arg
305 310 315 320

Arg Pro Phe Gly Val Ala Val Met Asp Ile Thr Asp Ile Ile Lys Gly
325 330 335

Lys Ala Glu Ser Asp Glu Glu Lys Gln His Phe Ile Pro Phe His Pro
340 345 350

Val Ser Ala Glu Asn Asp Phe Leu His Ser Leu Leu Gly Lys Val Ile
355 360 365

Ala Ser Lys Gly Asp Ser Gly Gly Gln Gly Leu Trp Val Thr Met Lys

370 375 380

Met Leu Val Gly Asp Ile Ile Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Pro His Leu
385 390 395 400

Val Asp Arg Thr Thr Val Val Ala Arg Lys Leu Gly Phe Pro Glu Ile
 405 410 415

Ile Met Pro Gly Asp Val Arg Asn Asp Ile Tyr Ile Thr Leu Leu Gln
 420 425 430

Gly Asp Phe Asp Lys Tyr Thr Lys Thr Thr Gln Arg Asn Val Glu Val
 435 440 445

Ile Met Cys Val Cys Thr Glu Asp Gly Lys Val Leu Pro Asn Ala Ile
 450 455 460

Cys Val Gly Ala Gly Asp Lys Ala Met Asn Glu Tyr His Ser Val Val
465 470 475 480

Tyr Tyr Gln Val Lys Gln Pro Arg Trp Met Glu Thr Val Lys Val Ala
 485 490 495

Val Pro Ile Glu Asp Met Gln Arg Ile His Leu Arg Phe Met Phe Arg
 500 505 510

His Arg Ser Ser Leu Glu Ser Lys Asp Lys Gly Glu Lys Asn Phe Ala
 515 520 525

Met Ser Tyr Val Lys Leu Met Lys Glu Asp Gly Thr Thr Leu His Asp
530 535 540

Gly Tyr His Glu Leu Val Val Leu Lys Gly Asp Ser Lys Lys Met Glu
545 550 555 560

Asp Ala Ser Ala Tyr Leu Thr Leu Pro Ser Tyr Arg His Pro Val Glu
565 570 575

Asn Lys Gly Ala Thr Leu Ser Arg Ser Ser Ser Ser Val Gly Gly Leu
580 585 590

Ser Val Ser Ser Arg Asp Val Phe Ser Ile Ser Thr Leu Val Cys Ser
595 600 605

Thr Lys Leu Thr Gln Asn Val Gly Leu Leu Gly Leu Leu Lys Trp Arg
610 615 620

Met Lys Pro Gln Leu Leu Gln Glu Asn Leu Glu Lys Leu Lys Ile Val
625 630 635 640

Asp Gly Glu Glu Val Val Lys Phe Leu Gln Asp Thr Leu Asp Ala Leu
645 650 655

Phe Asn Ile Met Met Glu His Ser Gln Ser Asn Glu Tyr Asp Ile Leu
660 665 670

Val Phe Asp Ala Leu Ile Tyr Ile Ile Gly Leu Ile Ala Asp Arg Lys
675 680 685

Phe Gln His Phe Asn Thr Val Leu Glu Ala Tyr Ile Gln Gln His Phe
690 695 700

Ser Ala Thr Leu Ala Tyr Lys Lys Leu Met Thr Val Leu Lys Thr Tyr
705 710 715 720

Leu Asp Thr Ser Ser Arg Gly Glu Gln Cys Glu Pro Ile Leu Arg Thr
725 730 735

Leu Lys Ala Leu Glu Tyr Val Phe Lys Phe Ile Val Arg Ser Arg Thr
740 745 750

Leu Phe Ser Gln Leu Tyr Glu Gly Lys Glu Gln Met Glu Phe Glu Glu
755 760 765

Ser Met Arg Arg Leu Phe Glu Ser Ile Asn Asn Leu Met Lys Ser Gln
770 775 780

Tyr Lys Thr Thr Ile Leu Leu Gln Val Ala Ala Leu Lys Tyr Ile Pro
785 790 795 800

Ser Val Leu His Asp Val Glu Thr Val Phe Asp Ala Lys Leu Leu Ser
805 810 815

Gln Leu Leu Tyr Glu Phe Tyr Thr Cys Ile Pro Pro Val Lys Leu Gln
820 825 830

Lys Gln Lys Val Gln Ser Met Asn Glu Ile Val Gln Ser Asn Leu Phe

835

840

845

Lys Lys Gln Glu Cys Arg Asp Ile Leu Leu Pro Val Ile Thr Lys Glu

850

855

860

Leu Lys Glu Leu Leu Glu Gln Arg Asp Asp Gly Gln His Gln Ala Glu

865

870

875

880

Lys Lys His Cys Val Glu Leu Leu Asn Ser Ile Leu Glu Val Leu Ser

885

890

895

Cys Gln Asp Ala Ala Phe Thr Tyr Asp His Ile Gln Glu Ile Met Val

900

905

910

Gln Leu Leu Arg Thr Val Asn Arg Thr Val Ile Thr Met Gly Arg Asp

915

920

925

His Ala Leu Ile Ser His Phe Glu Ala Cys Met Thr Ala Ile Leu Asp

930

935

940

Gln Met Gly Asp Gln His Tyr Ser Phe Tyr Ile Glu Thr Phe Gln Thr

945

950

955

960

Ser Ser Asp Leu Val Asp Phe Leu Met Glu Thr Phe Ile Met Phe Lys

965

970

975

Asp Leu Ile Gly Lys Asn Val Tyr Pro Gly Asp Trp Met Ala Met Ser

980

985

990

Met Val Gln Asn Arg Val Phe Leu Arg Ala Ile Asn Lys Phe Ala Glu
995 1000 1005

Thr Met Asn Gln Lys Phe Leu Glu His Thr Ser Phe Glu Phe Gln Leu
1010 1015 1020

Trp Asn Asn Tyr Phe His Leu Ala Val Ala Phe Ile Thr Gln Asp Ser
1025 1030 1035 1040

Leu Gln Leu Glu Gln Phe Thr His Ala Lys Tyr Asn Lys Ile Leu Asn
1045 1050 1055

Lys Tyr Gly Asp Met Arg Arg Leu Ile Gly Phe Ser Ile Arg Asp Met
1060 1065 1070

Trp Tyr Lys Leu Gly Gln Asn Lys Ile Cys Phe Ile Pro Gly Met Val
1075 1080 1085

Gly Pro Ile Leu Glu Met Thr Leu Ile Pro Glu Ala Glu Leu Arg Lys
1090 1095 1100

Ala Thr Ile Pro Ile Phe Phe Asp Met Met Leu Cys Glu Tyr Gln Arg
1105 1110 1115 1120

Thr Gly Ala Phe Lys Lys Phe Glu Asn Glu Ile Ile Leu Lys Leu Asp
1125 1130 1135

His Glu Val Glu Gly Gly Arg Gly Asp Glu Gln Tyr Met Gln Leu Leu
1140 1145 1150

Glu Ser Ile Leu Met Glu Cys Thr Ala Glu His Pro Thr Ile Ala Lys
1155 1160 1165

Ser Val Glu Asn Phe Val Ser Leu Val Lys Gly Leu Leu Glu Lys Leu
1170 1175 1180

Leu Asp Tyr Arg Gly Val Met Thr Asp Glu Ser Lys Asp Asn Arg Met
1185 1190 1195 1200

Ser Cys Thr Val Asn Leu Leu Asn Phe Tyr Lys Asp Asn Asn Arg Glu
1205 1210 1215

Glu Met Tyr Ile Arg Tyr Leu Tyr Lys Leu Arg Asp Leu His Leu Asp
1220 1225 1230

Cys Glu Asn Tyr Thr Glu Ala Ala Tyr Thr Leu Leu Leu His Thr Trp
1235 1240 1245

Leu Leu Lys Trp Ser Asp Glu Gln Cys Ala Ser Gln Val Met Gln Thr
1250 1255 1260

Gly Gln Gln His Pro Gln Thr His Arg Gln Leu Lys Glu Thr Leu Tyr
1265 1270 1275 1280

Glu Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Asp Lys Gly Lys Met Trp Glu Glu Ala
1285 1290 1295

Ile Ser Leu Cys Lys Glu Leu Ala Glu Gln Tyr Glu Met Glu Ile Phe

1300

1305

1310

Asp Tyr Glu Leu Leu Ser Gln Asn Leu Thr Gln Gln Ala Lys Phe Tyr

1315

1320

1325

Glu Asn Ile Met Lys Ile Leu Arg Thr Lys Pro Asp Tyr Phe Ala Val

1330

1335

1340

Gly Tyr Tyr Gly Gln Gly Phe Pro Ser Phe Leu Arg Asn Lys Val Phe

1345

1350

1355

1360

Ile Tyr Arg Gly Lys Glu Tyr Glu Arg Arg Glu Asp Phe Gln Met Gln

1365

1370

1375

Leu Leu Ser Gln Phe Pro Asn Ala Glu Lys Met Asn Thr Thr Ser Ala

1380

1385

1390

Pro Gly Asp Asp Val Arg Asn Ala Pro Gly Gln Tyr Ile Gln Cys Phe

1395

1400

1405

Thr Val Gln Pro Val Leu Asp Glu His Pro Arg Phe Lys Asn Lys Pro

1410

1415

1420

Val Pro Asp Gln Ile Ile Asn Phe Tyr Lys Ser Asn Tyr Val Gln Lys

1425

1430

1435

1440

Phe His Tyr Ser Arg Pro Val Arg Arg Gly Lys Val Asp Pro Glu Asn

1445

1450

1455

Glu Phe Ala Ser Met Trp Ile Glu Arg Thr Ser Phe Leu Thr Ala Tyr
1460 1465 1470

Lys Leu Pro Gly Ile Leu Arg Trp Phe Glu Val Val His Met Ser Gln
1475 1480 1485

Thr Thr Ile Ser Pro Leu Glu Asn Ala Ile Glu Thr Met Ser Thr Val
1490 1495 1500

Asn Glu Lys Ile Leu Met Met Ile Asn Gln Tyr Gln Ser Asp Glu Ser
1505 1510 1515 1520

Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Met Leu Leu Asn Gly Ile Val Asp Pro
1525 1530 1535

Ala Val Met Gly Gly Phe Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Phe Phe Thr Glu
1540 1545 1550

Glu Tyr Ser Arg Glu His Pro Glu Asp Gln Asp Lys Leu Ser His Leu
1555 1560 1565

Lys Asp Leu Ile Ala Trp Gln Ile Pro Phe Leu Gly Ala Gly Ile Lys
1570 1575 1580

Ile His Glu Lys Arg Val Ser Asp Asn Leu Arg Pro Phe His Asp Arg
1585 1590 1595 1600

Met Glu Glu Cys Phe Lys Asn Leu Lys Met Lys Val Glu Lys Glu Tyr
1605 1610 1615

Gly Val Arg Glu Met Pro Asp Phe Glu Asp Arg Arg Val Gly Arg Pro
1620 1625 1630

Arg Ser Met Leu Arg Ser Tyr Arg Gln Met Ser Val Ile Ser Leu Ala
1635 1640 1645

Ser Met His Ser Asp Cys Ser Thr Pro Ser Lys Val Pro Ala Glu Ser
1650 1655 1660

Phe Asp Leu Glu Ser Ala Pro Pro Lys Thr Pro Lys Val Glu Glu Glu
1665 1670 1675 1680

Pro Ile Ser Pro Gly Ser Thr Leu Pro Glu Val Lys Leu Arg Arg Ser
1685 1690 1695

Lys Lys Arg Thr Lys Arg Ser Ser Val Val Phe Ala Asp Glu Lys Ala
1700 1705 1710

Ala Thr Glu Ser Asp Leu Lys Arg Leu Ser Arg Lys Gln Glu Phe Met
1715 1720 1725

Ser Asp Thr Asn Leu Ser Glu His Ala Ala Ile Pro Ala Arg Val Ser
1730 1735 1740

Ile Leu Ser Gln Met Ser Phe Ala Ser Gln Ser Met Pro Thr Ile Pro
1745 1750 1755 1760

Ala Leu Thr Leu Ser Val Ala Gly Val Pro Gly Leu Asp Glu Ala Asn

1765

1770

1775

Thr Ser Pro Arg Leu Ser Gln Thr Phe Phe Gln Val Ser Asp Gly Asp

1780

1785

1790

Lys Lys Thr Leu Lys Lys Lys Lys Val Asn Gln Phe Phe Lys Thr Met

1795

1800

1805

Leu Ala Ser Lys Ser Ser Glu Glu Ser Lys Gln Ile Pro Asp Phe Leu

1810

1815

1820

Ser Thr Asn Met

1825

<210> 2

<211> 1830

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Pro Trp Arg Lys Ala Asp Lys Glu Arg His Gly Val Ala Ile

1

5

10

15

Tyr Asn Phe Gln Gly Ser Gly Ala Pro Gln Leu Ser Leu Gln Ile Gly

20

25

30

Asp Val Val Arg Ile Gln Glu Thr Cys Gly Asp Trp Tyr Arg Gly Tyr

35

40

45

Leu Ile Lys His Lys Met Leu Gln Gly Ile Phe Pro Lys Ser Phe Ile
50 55 60

His Ile Lys Glu Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Asn Thr Glu Asn Ile
65 70 75 80

Ile Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ala Gln Glu Val Thr Thr Thr Leu Trp
85 90 95

Glu Trp Gly Ser Ile Trp Lys Gln Leu Tyr Val Ala Ser Lys Lys Glu
100 105 110

Arg Phe Leu Gln Val Gln Ser Met Met Tyr Asp Leu Met Glu Trp Arg
115 120 125

Ser Gln Leu Leu Ser Gly Thr Leu Pro Lys Asp Glu Leu Lys Glu Leu
130 135 140

Lys Gln Lys Val Thr Ser Lys Ile Asp Tyr Gly Asn Lys Ile Leu Glu
145 150 155 160

Leu Asp Leu Ile Val Arg Asp Glu Asp Gly Asn Ile Leu Asp Pro Asp
165 170 175

Asn Thr Ser Val Ile Ser Leu Phe His Ala His Glu Glu Ala Thr Asp
180 185 190

Lys Ile Thr Glu Arg Ile Lys Glu Glu Met Ser Lys Asp Gln Pro Asp

195

200

205

Tyr Ala Met Tyr Ser Arg Ile Ser Ser Ser Pro Thr His Ser Leu Tyr

210

215

220

Val Phe Val Arg Asn Phe Val Cys Arg Ile Gly Glu Asp Ala Glu Leu

225

230

235

240

Phe Met Ser Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Gln Thr Val Ile Ser Glu Asn

245

250

255

Tyr Leu Val Arg Trp Gly Ser Arg Gly Phe Pro Lys Glu Ile Glu Met

260

265

270

Leu Asn Asn Leu Lys Val Val Phe Thr Asp Leu Gly Asn Lys Asp Leu

275

280

285

Asn Arg Asp Lys Ile Tyr Leu Ile Cys Gln Ile Val Arg Val Gly Lys

290

295

300

Met Asp Leu Lys Asp Thr Gly Ala Lys Lys Cys Thr Gln Gly Leu Arg

305

310

315

320

Arg Pro Phe Gly Val Ala Val Met Asp Ile Thr Asp Ile Ile Lys Gly

325

330

335

Lys Ala Glu Ser Asp Glu Glu Lys Gln His Phe Ile Pro Phe His Pro

340

345

350

Val Thr Ala Glu Asn Asp Phe Leu His Ser Leu Leu Gly Lys Val Ile
355 360 365

Ala Ser Lys Gly Asp Ser Gly Gly Gln Gly Leu Trp Val Thr Met Lys
370 375 380

Met Leu Val Gly Asp Ile Ile Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Pro His Leu
385 390 395 400

Val Asp Arg Thr Thr Val Val Ala Arg Lys Leu Gly Phe Pro Glu Ile
405 410 415

Ile Met Pro Gly Asp Val Arg Asn Asp Ile Tyr Ile Thr Leu Leu Gln
420 425 430

Gly Asp Phe Asp Lys Tyr Asn Lys Thr Thr Gln Arg Asn Val Glu Val
435 440 445

Ile Met Cys Val Cys Ala Glu Asp Gly Lys Thr Leu Pro Asn Ala Ile
450 455 460

Cys Val Gly Ala Gly Asp Lys Pro Met Asn Glu Tyr Arg Ser Val Val
465 470 475 480

Tyr Tyr Gln Val Lys Gln Pro Arg Trp Met Glu Thr Val Lys Val Ala
485 490 495

Val Pro Ile Glu Asp Met Gln Arg Ile His Leu Arg Phe Met Phe Arg
500 505 510

His Arg Ser Ser Leu Glu Ser Lys Asp Lys Gly Glu Lys Asn Phe Ala
515 520 525

Met Ser Tyr Val Lys Leu Met Lys Glu Asp Gly Thr Thr Leu His Asp
530 535 540

Gly Phe His Asp Leu Val Val Leu Lys Gly Asp Ser Lys Lys Met Glu
545 550 555 560

Asp Ala Ser Ala Tyr Leu Thr Leu Pro Ser Tyr Arg His His Val Glu
565 570 575

Asn Lys Gly Ala Thr Leu Ser Arg Ser Ser Ser Ser Val Gly Gly Leu
580 585 590

Ser Val Ser Ser Arg Asp Val Phe Ser Ile Ser Thr Leu Val Cys Ser
595 600 605

Thr Lys Leu Thr Gln Asn Val Gly Leu Leu Gly Leu Leu Lys Trp Arg
610 615 620

Met Lys Pro Gln Leu Leu Gln Glu Asn Leu Glu Lys Leu Lys Ile Val
625 630 635 640

Asp Gly Glu Glu Val Val Lys Phe Leu Gln Asp Thr Leu Asp Ala Leu
645 650 655

Phe Asn Ile Met Met Glu His Ser Gln Ser Asp Glu Tyr Asp Ile Leu

660

665

670

Val Phe Asp Ala Leu Ile Tyr Ile Ile Gly Leu Ile Ala Asp Arg Lys

675

680

685

Phe Gln His Phe Asn Thr Val Leu Glu Ala Tyr Ile Gln Gln His Phe

690

695

700

Ser Ala Thr Leu Ala Tyr Lys Lys Leu Met Thr Val Leu Lys Thr Tyr

705

710

715

720

Leu Asp Thr Ser Ser Arg Gly Glu Gln Cys Glu Pro Ile Leu Arg Thr

725

730

735

Leu Lys Ala Leu Glu Tyr Val Phe Lys Phe Ile Val Arg Ser Arg Thr

740

745

750

Leu Phe Ser Gln Leu Tyr Glu Gly Lys Glu Gln Met Glu Phe Glu Glu

755

760

765

Ser Met Arg Arg Leu Phe Glu Ser Ile Asn Asn Leu Met Lys Ser Gln

770

775

780

Tyr Lys Thr Thr Ile Leu Leu Gln Val Ala Ala Leu Lys Tyr Ile Pro

785

790

795

800

Ser Val Leu His Asp Val Glu Met Val Phe Asp Ala Lys Leu Leu Ser

805

810

815

Gln Leu Leu Tyr Glu Phe Tyr Thr Cys Ile Pro Pro Val Lys Leu Gln
820 825 830

Lys Gln Lys Val Gln Ser Met Asn Glu Ile Val Gln Ser Asn Leu Phe
835 840 845

Lys Lys Gln Glu Cys Arg Asp Ile Leu Leu Pro Val Ile Thr Lys Glu
850 855 860

Leu Lys Glu Leu Leu Glu Gln Lys Asp Asp Met Gln His Gln Val Leu
865 870 875 880

Glu Arg Lys Tyr Cys Val Glu Leu Leu Asn Ser Ile Leu Glu Val Leu
885 890 895

Ser Tyr Gln Asp Ala Ala Phe Thr Tyr His His Ile Gln Glu Ile Met
900 905 910

Val Gln Leu Leu Arg Thr Val Asn Arg Thr Val Ile Thr Met Gly Arg
915 920 925

Asp His Ile Leu Ile Ser His Phe Val Ala Cys Met Thr Ala Ile Leu
930 935 940

Asn Gln Met Gly Asp Gln His Tyr Ser Phe Tyr Ile Glu Thr Phe Gln
945 950 955 960

Thr Ser Ser Glu Leu Val Asp Phe Leu Met Glu Thr Phe Ile Met Phe
965 970 975

Lys Asp Leu Ile Gly Lys Asn Val Tyr Pro Gly Asp Trp Met Ala Met
980 985 990

Ser Met Val Gln Asn Arg Val Phe Leu Arg Ala Ile Asn Lys Phe Ala
995 1000 1005

Glu Thr Met Asn Gln Lys Phe Leu Glu His Thr Asn Phe Glu Phe Gln
1010 1015 1020

Leu Trp Asn Asn Tyr Phe His Leu Ala Val Ala Phe Ile Thr Gln Asp
1025 1030 1035 1040

Ser Leu Gln Leu Glu Gln Phe Ser His Ala Lys Tyr Asn Lys Ile Leu
1045 1050 1055

Asn Lys Tyr Gly Asp Met Arg Arg Leu Ile Gly Phe Ser Ile Arg Asp
1060 1065 1070

Met Trp Tyr Lys Leu Gly Gln Asn Lys Ile Cys Phe Ile Pro Gly Met
1075 1080 1085

Val Gly Pro Ile Leu Glu Met Thr Leu Ile Pro Glu Ala Glu Leu Arg
1090 1095 1100

Lys Ala Thr Ile Pro Ile Phe Phe Asp Met Met Leu Cys Glu Tyr Gln
1105 1110 1115 1120

Arg Ser Gly Asp Phe Lys Lys Phe Glu Asn Glu Ile Ile Leu Lys Leu

| | | |
|---|------|------|
| 1125 | 1130 | 1135 |
| Asp His Glu Val Glu Gly Gly Arg Gly Asp Glu Gln Tyr Met Gln Leu | | |
| 1140 | 1145 | 1150 |
| Leu Glu Ser Ile Leu Met Glu Cys Ala Ala Glu His Pro Thr Ile Ala | | |
| 1155 | 1160 | 1165 |
| Lys Ser Val Glu Asn Phe Val Asn Leu Val Lys Gly Leu Leu Glu Lys | | |
| 1170 | 1175 | 1180 |
| Leu Leu Asp Tyr Arg Gly Val Met Thr Asp Glu Ser Lys Asp Asn Arg | | |
| 1185 | 1190 | 1195 |
| | | 1200 |
| Met Ser Cys Thr Val Asn Leu Leu Asn Phe Tyr Lys Asp Asn Asn Arg | | |
| 1205 | 1210 | 1215 |
| Glu Glu Met Tyr Ile Arg Tyr Leu Tyr Lys Leu Arg Asp Leu His Leu | | |
| 1220 | 1225 | 1230 |
| Asp Cys Asp Asn Tyr Thr Glu Ala Ala Tyr Thr Leu Leu Leu His Thr | | |
| 1235 | 1240 | 1245 |
| Trp Leu Leu Lys Trp Ser Asp Glu Gln Cys Ala Ser Gln Val Met Gln | | |
| 1250 | 1255 | 1260 |
| Thr Gly Gln Gln His Pro Gln Thr His Arg Gln Leu Lys Glu Thr Leu | | |
| 1265 | 1270 | 1275 |
| | | 1280 |

Tyr Glu Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Asp Lys Gly Lys Met Trp Glu Glu
1285 1290 1295

Ala Ile Ser Leu Cys Lys Glu Leu Ala Glu Gln Tyr Glu Met Glu Ile
1300 1305 1310

Phe Asp Tyr Glu Leu Leu Ser Gln Asn Leu Ile Gln Gln Ala Lys Phe
1315 1320 1325

Tyr Glu Ser Ile Met Lys Ile Leu Arg Pro Lys Pro Asp Tyr Phe Ala
1330 1335 1340

Val Gly Tyr Tyr Gly Gln Gly Phe Pro Ser Phe Leu Arg Asn Lys Val
1345 1350 1355 1360

Phe Ile Tyr Arg Gly Lys Glu Tyr Glu Arg Arg Glu Asp Phe Gln Met
1365 1370 1375

Gln Leu Met Thr Gln Phe Pro Asn Ala Glu Lys Met Asn Thr Thr Ser
1380 1385 1390

Ala Pro Gly Asp Asp Val Lys Asn Ala Pro Gly Gln Tyr Ile Gln Cys
1395 1400 1405

Phe Thr Val Gln Pro Val Leu Asp Glu His Pro Arg Phe Lys Asn Lys
1410 1415 1420

Pro Val Pro Asp Gln Ile Ile Asn Phe Tyr Lys Ser Asn Tyr Val Gln
1425 1430 1435 1440

Arg Phe His Tyr Ser Arg Pro Val Arg Arg Gly Thr Val Asp Pro Glu
1445 1450 1455

Asn Glu Phe Ala Ser Met Trp Ile Glu Arg Thr Ser Phe Val Thr Ala
1460 1465 1470

Tyr Lys Leu Pro Gly Ile Leu Arg Trp Phe Glu Val Val His Met Ser
1475 1480 1485

Gln Thr Thr Ile Ser Pro Leu Glu Asn Ala Ile Glu Thr Met Ser Thr
1490 1495 1500

Ala Asn Glu Lys Ile Leu Met Met Ile Asn Gln Tyr Gln Ser Asp Glu
1505 1510 1515 1520

Thr Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Met Leu Leu Asn Gly Ile Val Asp
1525 1530 1535

Pro Ala Val Met Gly Gly Phe Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Phe Phe Thr
1540 1545 1550

Glu Glu Tyr Val Arg Asp His Pro Glu Asp Gln Asp Lys Leu Thr His
1555 1560 1565

Leu Lys Asp Leu Ile Ala Trp Gln Ile Pro Phe Leu Gly Ala Gly Ile
1570 1575 1580

Lys Ile His Glu Lys Arg Val Ser Asp Asn Leu Arg Pro Phe His Asp

1585 1590 1595 1600

Arg Met Glu Glu Cys Phe Lys Asn Leu Lys Met Lys Val Glu Lys Glu

1605 1610 1615

Tyr Gly Val Arg Glu Met Pro Asp Phe Asp Asp Arg Arg Val Gly Arg

1620 1625 1630

Pro Arg Ser Met Leu Arg Ser Tyr Arg Gln Met Ser Ile Ile Ser Leu

1635 1640 1645

Ala Ser Met Asn Ser Asp Cys Ser Thr Pro Ser Lys Pro Thr Ser Glu

1650 1655 1660

Ser Phe Asp Leu Glu Leu Ala Ser Pro Lys Thr Pro Arg Val Glu Gln

1665 1670 1675 1680

Glu Glu Pro Ile Ser Pro Gly Ser Thr Leu Pro Glu Val Lys Leu Arg

1685 1690 1695

Arg Ser Lys Lys Arg Thr Lys Arg Ser Ser Val Val Phe Ala Asp Glu

1700 1705 1710

Lys Ala Ala Ala Glu Ser Asp Leu Lys Arg Leu Ser Arg Lys His Glu

1715 1720 1725

Phe Met Ser Asp Thr Asn Leu Ser Glu His Ala Ala Ile Pro Leu Lys

1730 1735 1740

Ala Ser Val Leu Ser Gln Met Ser Phe Ala Ser Gln Ser Met Pro Thr
1745 1750 1755 1760

Ile Pro Ala Leu Ala Leu Ser Val Ala Gly Ile Pro Gly Leu Asp Glu
1765 1770 1775

Ala Asn Thr Ser Pro Arg Leu Ser Gln Thr Phe Leu Gln Leu Ser Asp
1780 1785 1790

Gly Asp Lys Lys Thr Leu Thr Arg Lys Lys Val Asn Gln Phe Phe Lys
1795 1800 1805

Thr Met Leu Ala Ser Lys Ser Ala Glu Glu Gly Lys Gln Ile Pro Asp
1810 1815 1820

Ser Leu Ser Thr Asp Leu
1825 1830

<210> 3

<211> 727

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Pro Pro Pro Ser Asp Ile Val Lys Val Ala Ile Glu Trp Pro Gly
1 5 10 15

Ala Tyr Pro Lys Leu Met Glu Ile Asp Gln Lys Lys Pro Leu Ser Ala

20

25

30

Ile Ile Lys Glu Val Cys Asp Gly Trp Ser Leu Ala Asn His Glu Tyr

35

40

45

Phe Ala Leu Gln His Ala Asp Ser Ser Asn Phe Tyr Ile Thr Glu Lys

50

55

60

Asn Arg Asn Glu Ile Lys Asn Gly Thr Ile Leu Arg Leu Thr Thr Ser

65

70

75

80

Pro Ala Gln Asn Ala Gln Gln Leu His Glu Arg Ile Gln Ser Ser Ser

85

90

95

Met Asp Ala Lys Leu Glu Ala Leu Lys Asp Leu Ala Ser Leu Ser Arg

100

105

110

Asp Val Thr Phe Ala Gln Glu Phe Ile Asn Leu Asp Gly Ile Ser Leu

115

120

125

Leu Thr Gln Met Val Glu Ser Gly Thr Glu Arg Tyr Gln Lys Leu Gln

130

135

140

Lys Ile Met Lys Pro Cys Phe Gly Asp Met Leu Ser Phe Thr Leu Thr

145

150

155

160

Ala Phe Val Glu Leu Met Asp His Gly Ile Val Ser Trp Asp Thr Phe

165

170

175

Ser Val Ala Phe Ile Lys Lys Ile Ala Ser Phe Val Asn Lys Ser Ala
180 185 190

Ile Asp Ile Ser Ile Leu Gln Arg Ser Leu Ala Ile Leu Glu Ser Met
195 200 205

Val Leu Asn Ser His Asp Leu Tyr Gln Lys Val Ala Gln Glu Ile Thr
210 215 220

Ile Gly Gln Leu Ile Pro His Leu Gln Gly Thr Asp Gln Glu Ile Gln
225 230 235 240

Thr Tyr Thr Ile Ala Val Ile Asn Ala Leu Phe Leu Lys Ala Pro Asp
245 250 255

Glu Arg Arg Gln Glu Met Ala Asn Ile Leu Ala Gln Lys Gln Leu Arg
260 265 270

Tyr Ile Ile Leu Thr His Val Ile Arg Ala Gln Arg Ala Ile Asn Asn
275 280 285

Glu Met Ala His Gln Leu Tyr Val Leu Gln Val Leu Thr Phe Asn Leu
290 295 300

Leu Glu Asp Arg Met Met Thr Lys Met Asp Pro Gln Asp Gln Ala Gln
305 310 315 320

Arg Asp Ile Ile Phe Glu Leu Arg Arg Ile Ala Phe Asp Ala Glu Ser
325 330 335

Glu Pro Asn Asn Ser Ser Gly Ser Met Glu Lys Arg Lys Ser Met Tyr
340 345 350

Thr Arg Asp Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Ile Asn His Val Asn Pro Ala
355 360 365

Met Asp Phe Thr Gln Thr Pro Pro Gly Met Leu Ala Leu Asp Asn Met
370 375 380

Leu Tyr Phe Ala Lys His His Gln Asp Ala Tyr Ile Arg Ile Val Leu
385 390 395 400

Glu Asn Ser Ser Arg Glu Asp Lys His Glu Cys Pro Phe Gly Arg Ser
405 410 415

Ser Ile Glu Leu Thr Lys Met Leu Cys Glu Ile Leu Lys Val Gly Glu
420 425 430

Leu Pro Ser Glu Thr Cys Asn Asp Phe His Pro Met Phe Phe Thr His
435 440 445

Asp Arg Ser Phe Glu Glu Phe Phe Cys Ile Cys Ile Gln Leu Leu Asn
450 455 460

Lys Thr Trp Lys Glu Met Arg Ala Thr Ser Glu Asp Phe Asn Lys Val
465 470 475 480

Met Gln Val Val Lys Glu Gln Val Met Arg Ala Leu Thr Thr Lys Pro

485

490

495

Ser Ser Leu Asp Gln Phe Lys Ser Lys Leu Gln Asn Leu Ser Tyr Thr

500

505

510

Glu Ile Leu Lys Ile Arg Gln Ser Glu Arg Met Asn Gln Glu Asp Phe

515

520

525

Gln Ser Arg Pro Ile Leu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Pro Glu Ile

530

535

540

Leu Glu Leu Ile Lys Gln Gln Arg Leu Asn Arg Leu Val Glu Gly Thr

545

550

555

560

Cys Phe Arg Lys Leu Asn Ala Arg Arg Arg Gln Asp Lys Phe Trp Tyr

565

570

575

Cys Arg Leu Ser Pro Asn His Lys Val Leu His Tyr Gly Asp Leu Glu

580

585

590

Glu Ser Pro Gln Gly Glu Val Pro His Asp Ser Leu Gln Asp Lys Leu

595

600

605

Pro Val Ala Asp Ile Lys Ala Val Val Thr Gly Lys Asp Cys Pro His

610

615

620

Met Lys Glu Lys Gly Ala Leu Lys Gln Asn Lys Glu Val Leu Glu Leu

625

630

635

640

Ala Phe Ser Ile Leu Tyr Asp Ser Asn Cys Gln Leu Asn Phe Ile Ala
645 650 655

Pro Asp Lys His Glu Tyr Cys Ile Trp Thr Asp Gly Leu Asn Ala Leu
660 665 670

Leu Gly Lys Asp Met Met Ser Asp Leu Thr Arg Asn Asp Leu Asp Thr
675 680 685

Leu Leu Ser Met Glu Ile Lys Leu Arg Leu Leu Asp Leu Glu Asn Ile
690 695 700

Gln Ile Pro Asp Ala Pro Pro Pro Ile Pro Lys Glu Pro Ser Asn Tyr
705 710 715 720

Asp Phe Val Tyr Asp Cys Asn
725

<210> 4

<211> 727

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Pro Pro Ala Asp Ile Val Lys Val Ala Ile Glu Trp Pro Gly
1 5 10 15

Ala Tyr Pro Lys Leu Met Glu Ile Asp Gln Lys Lys Pro Leu Ser Ala

20

25

30

Ile Ile Lys Glu Val Cys Asp Gly Trp Ser Leu Ala Asn His Glu Tyr

35

40

45

Phe Ala Leu Gln His Ala Asp Ser Ser Asn Phe Tyr Ile Thr Glu Lys

50

55

60

Asn Arg Asn Glu Ile Lys Asn Gly Thr Ile Leu Arg Leu Thr Thr Ser

65

70

75

80

Pro Ala Gln Asn Ala Gln Gln Leu His Glu Arg Ile Gln Ser Ser Ser

85

90

95

Met Asp Ala Lys Leu Glu Ala Leu Lys Asp Leu Ala Ser Leu Ser Arg

100

105

110

Asp Val Thr Phe Ala Gln Glu Phe Ile Asn Leu Asp Gly Ile Ser Leu

115

120

125

Leu Thr Gln Met Val Glu Ser Gly Thr Glu Arg Tyr Gln Lys Leu Gln

130

135

140

Lys Ile Met Lys Pro Cys Phe Gly Asp Met Leu Ser Phe Thr Leu Thr

145

150

155

160

Ala Phe Val Glu Leu Met Asp His Gly Ile Val Ser Trp Asp Thr Phe

165

170

175

Ser Val Ala Phe Ile Lys Lys Ile Ala Ser Phe Val Asn Lys Ser Ala
180 185 190

Ile Asp Ile Ser Ile Leu Gln Arg Ser Leu Ala Ile Leu Glu Ser Met
195 200 205

Val Leu Asn Ser His Asp Leu Tyr Gln Lys Val Ala Gln Glu Ile Thr
210 215 220

Ile Gly Gln Leu Ile Pro His Leu Gln Gly Ser Asp Gln Glu Ile Gln
225 230 235 240

Thr Tyr Thr Ile Ala Val Ile Asn Ala Leu Phe Leu Lys Ala Pro Asp
245 250 255

Glu Arg Arg Gln Glu Met Ala Asn Ile Leu Ala Gln Lys Gln Leu Arg
260 265 270

Ser Ile Ile Leu Thr His Val Ile Arg Ala Gln Arg Ala Ile Asn Asn
275 280 285

Glu Met Ala His Gln Leu Tyr Val Leu Gln Val Leu Thr Phe Asn Leu
290 295 300

Leu Glu Asp Arg Met Met Thr Lys Met Asp Pro Gln Asp Gln Ala Gln
305 310 315 320

Arg Asp Ile Ile Phe Glu Leu Arg Arg Ile Ala Phe Asp Ala Glu Ser
325 330 335

Glu Pro Asn Asn Ser Ser Gly Ser Met Glu Lys Arg Lys Ser Met Tyr
340 345 350

Thr Arg Asp Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Ile Asn His Val Asn Pro Ala
355 360 365

Met Asp Phe Thr Gln Thr Pro Pro Gly Met Leu Ala Leu Asp Asn Met
370 375 380

Leu Tyr Phe Ala Lys His His Gln Asp Ala Tyr Ile Arg Ile Val Leu
385 390 395 400

Glu Asn Ser Ser Arg Glu Asp Lys His Glu Cys Pro Phe Gly Arg Ser
405 410 415

Ser Ile Glu Leu Thr Lys Met Leu Cys Glu Ile Leu Lys Val Gly Glu
420 425 430

Leu Pro Ser Glu Thr Cys Asn Asp Phe His Pro Met Phe Phe Thr His
435 440 445

Asp Arg Ser Phe Glu Glu Phe Phe Cys Ile Cys Ile Gln Leu Leu Asn
450 455 460

Lys Thr Trp Lys Glu Met Arg Ala Thr Ser Glu Asp Phe Asn Lys Val
465 470 475 480

Met Gln Val Val Lys Glu Gln Val Met Arg Ala Leu Thr Thr Lys Pro

485

490

495

Ser Ser Leu Asp Gln Phe Lys Ser Lys Leu Gln Asn Leu Ser Tyr Thr

500

505

510

Glu Ile Leu Lys Ile Arg Gln Ser Glu Arg Met Asn Gln Glu Asp Phe

515

520

525

Gln Ser Arg Pro Ile Leu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Pro Glu Ile

530

535

540

Leu Glu Leu Ile Lys Gln Gln Arg Leu Asn Arg Leu Val Glu Gly Thr

545

550

555

560

Cys Phe Arg Lys Leu Asn Ala Arg Arg Arg Gln Asp Lys Phe Trp Tyr

565

570

575

Cys Arg Leu Ser Pro Asn His Lys Val Leu His Tyr Gly Asp Leu Glu

580

585

590

Glu Ser Pro Gln Gly Glu Val Pro His Asp Ser Leu Gln Asp Lys Leu

595

600

605

Pro Val Ala Asp Ile Lys Ala Val Val Thr Gly Lys Asp Cys Pro His

610

615

620

Met Lys Glu Lys Gly Ala Leu Lys Gln Asn Lys Glu Val Leu Glu Leu

625

630

635

640

Ala Phe Ser Ile Leu Tyr Asp Ser Asn Cys Gln Leu Asn Phe Ile Ala
645 650 655

Pro Asp Lys His Glu Tyr Cys Ile Trp Thr Asp Gly Leu Asn Ala Leu
660 665 670

Leu Gly Lys Asp Met Met Ser Asp Leu Thr Arg Asn Asp Leu Asp Thr
675 680 685

Leu Leu Ser Met Glu Ile Lys Leu Arg Leu Leu Asp Leu Glu Asn Ile
690 695 700

Gln Ile Pro Asp Ala Pro Pro Pro Ile Pro Lys Glu Pro Ser Asn Tyr
705 710 715 720

Asp Phe Val Tyr Asp Cys Asn
725

<210> 5

<211> 1591

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Gly Asn Ala Glu Ser Gln Asn Val Asp His Glu Phe Tyr Gly Glu
1 5 10 15

Lys His Ala Ser Leu Gly Arg Lys His Thr Ser Arg Ser Leu Arg Leu

20

25

30

Ser His Lys Thr Arg Arg Thr Arg His Ala Ser Ser Gly Lys Ala Ile

35

40

45

His Arg Asn Ser Glu Val Ser Thr Arg Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ile

50

55

60

Pro Gln Ser Leu Ala Glu Asn Gly Leu Glu Pro Phe Ser Gln Glu Gly

65

70

75

80

Ala Leu Asp Asp Phe Gly Asp Pro Ile Trp Val Asp Arg Val Asp Met

85

90

95

Gly Leu Arg Pro Val Ser Tyr Thr Asp Ser Ser Val Thr Pro Ser Val

100

105

110

Asp Gly Ser Ile Val Leu Thr Ala Ala Ser Val Gln Ser Met Pro Asp

115

120

125

Ser Glu Glu Ser Arg Leu Tyr Gly Asp Asp Ala Thr Tyr Leu Ala Glu

130

135

140

Gly Gly Arg Arg Gln Cys Pro Tyr Thr Ser Asn Gly Pro Thr Phe Met

145

150

155

160

Glu Thr Ala Ser Phe Lys Lys Lys Arg Ser Lys Ser Ala Asp Ile Trp

165

170

175

Arg Glu Asp Ser Leu Glu Phe Ser Leu Ser Asp Leu Ser Gln Glu His
180 185 190

Leu Thr Ser Asn Glu Glu Ile Leu Gly Ser Ala Glu Glu Lys Asp Cys
195 200 205

Glu Glu Ala Arg Gly Met Glu Thr Glu Ala Ser Pro Arg Gln Leu Ser
210 215 220

Thr Cys Gln Arg Ala Asn Ser Leu Gly Asp Leu Tyr Ala Gln Lys Asn
225 230 235 240

Ser Gly Val Lys Ala Asn Gly Gly Pro Arg Asn Arg Phe Ser Ser Tyr
245 250 255

Cys Arg Asn Leu Val Ser Asp Ile Pro Asp Leu Ala Lys His Lys Met
260 265 270

Pro Pro Ala Ala Ala Glu Glu Thr Pro Pro Tyr Ser Asn Tyr Asn Thr
275 280 285

Leu Pro Cys Arg Lys Ser His Cys Leu Ser Glu Gly Ala Thr Asn Pro
290 295 300

Gln Ile Ser Leu Ser Lys Ser Met Gln Gly Arg Arg Ala Lys Thr Thr
305 310 315 320

Gln Asp Val Asn Thr Gly Glu Gly Ser Glu Phe Ala Asp Ser Gly Ile
325 330 335

Glu Gly Ala Thr Thr Asp Thr Asp Leu Leu Ser Arg Arg Ser Asn Ala
340 345 350

Thr Asn Ser Ser Tyr Ser Pro Pro Thr Gly Arg Ala Phe Val Gly Ser
355 360 365

Asp Ser Gly Ser Ser Ser Thr Gly Asp Arg Ala Arg Gln Gly Val Tyr
370 375 380

Glu Asn Phe Arg Arg Glu Leu Glu Met Ser Thr Thr Asn Ser Glu Ser
385 390 395 400

Leu Glu Glu Ala Gly Ser Ala His Ser Asp Glu Gln Ser Ser Gly Thr
405 410 415

Leu Ser Ser Pro Gly Gln Ser Asp Ile Leu Leu Thr Ala Ala Gln Gly
420 425 430

Thr Val Arg Lys Ala Gly Ala Leu Ala Val Lys Asn Phe Leu Val His
435 440 445

Lys Lys Asn Lys Lys Val Glu Ser Ala Thr Arg Arg Lys Trp Lys His
450 455 460

Tyr Trp Val Ser Leu Lys Gly Cys Thr Leu Phe Phe Tyr Glu Thr Asp
465 470 475 480

Gly Arg Ser Gly Ile Asp His Asn Ser Val Pro Lys His Ala Val Trp

485

490

495

Val Glu Asn Ser Ile Val Gln Ala Val Pro Glu His Pro Lys Lys Asp

500

505

510

Phe Val Phe Cys Leu Ser Asn Ser Leu Gly Asp Ala Phe Leu Phe Gln

515

520

525

Thr Thr Ser Gln Thr Glu Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ala Ile His Ser

530

535

540

Ala Cys Ala Ala Ala Val Ala Arg His His His Lys Glu Asp Thr Leu

545

550

555

560

Arg Leu Leu Lys Ser Glu Ile Lys Lys Leu Glu Gln Lys Ile Asp Met

565

570

575

Asp Glu Lys Met Lys Lys Met Gly Glu Met Gln Leu Ser Ser Val Thr

580

585

590

Asp Ser Lys Lys Lys Lys Thr Ile Leu Asp Gln Ile Phe Val Trp Glu

595

600

605

Gln Asn Leu Glu Gln Phe Gln Met Asp Leu Phe Arg Phe Arg Cys Tyr

610

615

620

Leu Ala Ser Leu Gln Gly Gly Glu Leu Pro Asn Pro Lys Arg Leu Leu

625

630

635

640

Ala Phe Ala Ser Arg Pro Thr Lys Val Ala Met Gly Arg Leu Gly Ile
645 650 655

Phe Ser Val Ser Ser Phe His Ala Leu Val Ala Ala Arg Thr Gly Glu
660 665 670

Ile Gly Val Arg Arg Arg Thr Gln Ala Met Ser Arg Ser Ala Ser Lys
675 680 685

Arg Arg Ser Arg Phe Ser Ser Leu Trp Gly Leu Asp Thr Thr Ser Lys
690 695 700

Lys Lys Gln Gly Arg Pro Thr Ile Asn Gln Val Phe Gly Glu Gly Thr
705 710 715 720

Asp Ala Val Lys Arg Ser Leu Glu Gly Ile Phe Asp Asp Thr Val Pro
725 730 735

Asp Gly Lys Arg Glu Lys Glu Val Val Leu Pro Ser Val His Gln His
740 745 750

Asn Pro Asp Cys Asp Ile Trp Val His Glu Tyr Phe Thr Pro Ser Trp
755 760 765

Phe Cys Leu Pro Asn Asn Gln Pro Ala Leu Thr Val Val Arg Pro Gly
770 775 780

Asp Thr Ala Arg Asp Thr Leu Glu Leu Ile Cys Lys Thr His Gln Leu
785 790 795 800

Asp His Ser Ala His Tyr Leu Arg Leu Lys Phe Leu Met Glu Asn Arg
805 810 815

Val Gln Phe Tyr Ile Pro Gln Pro Glu Glu Asp Ile Tyr Glu Leu Leu
820 825 830

Tyr Lys Glu Ile Glu Ile Cys Pro Lys Val Thr Gln Asn Ile His Ile
835 840 845

Glu Lys Ser Asp Ala Ala Ala Asp Asn Tyr Gly Phe Leu Leu Ser Ser
850 855 860

Val Asp Glu Asp Gly Ile Arg Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Lys Glu
865 870 875 880

Thr Gly Leu Ala Ser Lys Lys Gly Leu Lys Ala Gly Asp Glu Ile Leu
885 890 895

Glu Ile Asn Asn Arg Ala Ala Gly Thr Leu Asn Ser Ser Met Leu Lys
900 905 910

Asp Phe Leu Ser Gln Pro Ser Leu Gly Leu Leu Val Arg Thr Tyr Pro
915 920 925

Glu Pro Glu Gly Gly Val Glu Leu Leu Glu Asn Pro Pro His Arg Val
930 935 940

Asp Gly Pro Val Asp Leu Gly Glu Ser Pro Leu Ala Phe Leu Thr Ser

945 950 955 960

Asn Pro Gly His Ser Leu Ser Ser Glu Gln Gly Ser Ser Ala Glu Thr
965 970 975

Ala Pro Glu Glu Gly Glu Gly Pro Asp Leu Glu Ser Ser Asp Glu Thr
980 985 990

Asp His Ser Ser Lys Ser Thr Glu Gln Val Ala Ala Phe Cys Arg Ser
995 1000 1005

Leu His Glu Met Ser Pro Ser Asp Ser Ser Pro Ser Pro Gln Asp Ala
1010 1015 1020

Thr Ser Pro Gln Leu Ala Thr Thr Arg Gln Leu Ser Asp Ala Asp Lys
1025 1030 1035 1040

Leu Arg Lys Val Ile Cys Glu Leu Leu Glu Thr Glu Arg Thr Tyr Val
1045 1050 1055

Lys Asp Leu Asn Cys Leu Met Glu Arg Tyr Leu Lys Pro Leu Gln Lys
1060 1065 1070

Glu Thr Phe Leu Thr Gln Asp Glu Leu Asp Val Leu Phe Gly Asn Leu
1075 1080 1085

Thr Glu Met Val Glu Phe Gln Val Glu Phe Leu Lys Thr Leu Glu Asp
1090 1095 1100

Gly Val Arg Leu Val Pro Asp Leu Glu Lys Leu Glu Lys Val Asp Gln
1105 1110 1115 1120

Phe Lys Lys Val Leu Phe Ser Leu Gly Gly Ser Phe Leu Tyr Tyr Ala
1125 1130 1135

Asp Arg Phe Lys Leu Tyr Ser Ala Phe Cys Ala Ser His Thr Lys Val
1140 1145 1150

Pro Lys Val Leu Val Lys Ala Lys Thr Asp Thr Ala Phe Lys Ala Phe
1155 1160 1165

Leu Asp Ala Gln Asn Pro Arg Gln Gln His Ser Ser Thr Leu Glu Ser
1170 1175 1180

Tyr Leu Ile Lys Pro Ile Gln Arg Val Leu Lys Tyr Pro Leu Leu Leu
1185 1190 1195 1200

Arg Glu Leu Phe Ala Leu Thr Asp Ala Glu Ser Glu Glu His Tyr His
1205 1210 1215

Leu Asp Val Ala Ile Lys Thr Met Asn Lys Val Ala Ser His Ile Asn
1220 1225 1230

Glu Met Gln Lys Ile His Glu Glu Phe Gly Ala Val Phe Asp Gln Leu
1235 1240 1245

Ile Ala Glu Gln Thr Gly Glu Lys Lys Glu Val Ala Asp Leu Ser Met
1250 1255 1260

Gly Asp Leu Leu Leu His Thr Ser Val Ile Trp Leu Asn Pro Pro Ala
1265 1270 1275 1280

Ser Leu Gly Lys Trp Lys Lys Glu Pro Glu Leu Ala Ala Phe Val Phe
1285 1290 1295

Lys Thr Ala Val Val Leu Val Tyr Lys Asp Gly Ser Lys Gln Lys Lys
1300 1305 1310

Lys Leu Val Gly Ser His Arg Leu Ser Ile Tyr Glu Glu Trp Asp Pro
1315 1320 1325

Phe Arg Phe Arg His Met Ile Pro Thr Glu Ala Leu Gln Val Arg Ala
1330 1335 1340

Leu Pro Ser Ala Asp Ala Glu Ala Asn Ala Val Cys Glu Ile Val His
1345 1350 1355 1360

Val Lys Ser Glu Ser Glu Gly Arg Pro Glu Arg Val Phe His Leu Cys
1365 1370 1375

Cys Ser Ser Pro Glu Ser Arg Lys Asp Phe Leu Lys Ser Val His Ser
1380 1385 1390

Ile Leu Arg Asp Lys His Arg Arg Gln Leu Leu Lys Thr Glu Ser Leu
1395 1400 1405

Pro Ser Ala Gln Gln Tyr Val Pro Phe Gly Gly Lys Arg Leu Cys Ala

1410

1415

1420

Leu Lys Gly Ala Arg Pro Ala Met Ser Arg Ala Val Ser Ala Pro Ser
1425 1430 1435 1440

Lys Ser Leu Gly Arg Arg Arg Arg Arg Leu Ala Arg Asn Arg Phe Thr
1445 1450 1455

Ile Asp Ser Asp Ala Ile Ser Ala Ser Ser Pro Glu Lys Glu Pro Gln
1460 1465 1470

Gln Pro Ala Gly Gly Gly Asp Thr Asp Arg Trp Val Glu Glu Gln Phe
1475 1480 1485

Asp Leu Ala Gln Tyr Glu Glu Gln Asp Asp Ile Lys Glu Thr Asp Ile
1490 1495 1500

Leu Ser Asp Asp Asp Glu Phe Cys Glu Ser Leu Lys Gly Ala Ser Val
1505 1510 1515 1520

Asp Arg Asp Leu Gln Glu Gln Leu Gln Ala Ala Ser Ile Ser Gln Arg
1525 1530 1535

Ala Arg Gly Arg Arg Thr Leu Asp Ser His Ala Ser Arg Met Thr Gln
1540 1545 1550

Leu Lys Lys Gln Ala Ala Leu Ser Gly Ile Asn Gly Gly Leu Glu Ser
1555 1560 1565

Ala Ser Glu Glu Val Ile Trp Val Arg Arg Glu Asp Phe Ala Pro Ser
1570 1575 1580

Arg Lys Leu Asn Thr Glu Ile
1585 1590

<210> 6

<211> 1591

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Asn Ala Glu Ser Gln His Val Glu His Glu Phe Tyr Gly Glu
1 5 10 15

Lys His Ala Ser Leu Gly Arg Asn Asp Thr Ser Arg Ser Leu Arg Leu
20 25 30

Ser His Lys Thr Arg Arg Thr Arg His Ala Ser Ser Gly Lys Val Ile
35 40 45

His Arg Asn Ser Glu Val Ser Thr Arg Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ile
50 55 60

Pro Gln Ser Leu Ala Glu Asn Gly Leu Glu Pro Phe Ser Gln Asp Gly
65 70 75 80

Thr Leu Glu Asp Phe Gly Ser Pro Ile Trp Val Asp Arg Val Asp Met

85

90

95

Gly Leu Arg Pro Val Ser Tyr Thr Asp Ser Ser Val Thr Pro Ser Val
100 105 110

Asp Ser Ser Ile Val Leu Thr Ala Ala Ser Val Gln Ser Met Pro Asp
115 120 125

Thr Glu Glu Ser Arg Leu Tyr Gly Asp Asp Ala Thr Tyr Leu Ala Glu
130 135 140

Gly Gly Arg Arg Gln His Ser Tyr Thr Ser Asn Gly Pro Thr Phe Met
145 150 155 160

Glu Thr Ala Ser Phe Lys Lys Lys Arg Ser Lys Ser Ala Asp Ile Trp
165 170 175

Arg Glu Asp Ser Leu Glu Phe Ser Leu Ser Asp Leu Ser Gln Glu His
180 185 190

Leu Thr Ser Asn Glu Glu Ile Leu Gly Ser Ala Glu Glu Lys Asp Cys
195 200 205

Glu Glu Ala Arg Gly Met Glu Thr Arg Ala Ser Pro Arg Gln Leu Ser
210 215 220

Thr Cys Gln Arg Ala Asn Ser Leu Gly Asp Leu Tyr Ala Gln Lys Asn
225 230 235 240

Ser Gly Val Thr Ala Asn Met Gly Pro Gly Ser Lys Phe Ala Gly Tyr
245 250 255

Cys Arg Asn Leu Val Ser Asp Ile Pro Asn Leu Ala Asn His Lys Met
260 265 270

Pro Pro Ala Ala Ala Glu Glu Thr Pro Pro Tyr Ser Asn Tyr Asn Thr
275 280 285

Leu Pro Cys Arg Lys Ser His Cys Leu Ser Glu Gly Ala Thr Asn Pro
290 295 300

Gln Ile Ser His Ser Asn Ser Met Gln Gly Arg Arg Ala Lys Thr Thr
305 310 315 320

Gln Asp Val Asn Ala Gly Glu Gly Ser Glu Phe Ala Asp Ser Gly Ile
325 330 335

Glu Gly Ala Thr Thr Asp Thr Asp Leu Leu Ser Arg Arg Ser Asn Ala
340 345 350

Thr Asn Ser Ser Tyr Ser Pro Thr Thr Gly Arg Ala Phe Val Gly Ser
355 360 365

Asp Ser Gly Ser Ser Ser Thr Gly Asp Ala Ala Arg Gln Gly Val Tyr
370 375 380

Glu Asn Phe Arg Arg Glu Leu Glu Met Ser Thr Thr Asn Ser Glu Ser
385 390 395 400

Leu Glu Glu Ala Gly Ser Ala His Ser Asp Glu Gln Ser Ser Gly Thr
405 410 415

Leu Ser Ser Pro Gly Gln Ser Asp Ile Leu Leu Thr Ala Ala Gln Gly
420 425 430

Thr Val Arg Lys Ala Gly Ala Leu Ala Val Lys Asn Phe Leu Val His
435 440 445

Lys Lys Asn Lys Lys Val Glu Ser Ala Thr Arg Arg Lys Trp Lys His
450 455 460

Tyr Trp Val Ser Leu Lys Gly Cys Thr Leu Phe Phe Tyr Glu Ser Asp
465 470 475 480

Gly Arg Ser Gly Ile Asp His Asn Ser Ile Pro Lys His Ala Val Trp
485 490 495

Val Glu Asn Ser Ile Val Gln Ala Val Pro Glu His Pro Lys Lys Asp
500 505 510

Phe Val Phe Cys Leu Ser Asn Ser Leu Gly Asp Ala Phe Leu Phe Gln
515 520 525

Thr Thr Ser Gln Thr Glu Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ala Ile His Ser
530 535 540

Ala Cys Ala Thr Ala Val Ala Arg His His His Lys Glu Asp Thr Leu

545 550 555 560

Arg Leu Leu Lys Ser Glu Ile Lys Lys Leu Glu Gln Lys Ile Asp Met

565 570 575

Asp Glu Lys Met Lys Lys Met Gly Glu Met Gln Leu Ser Ser Val Thr

580 585 590

Asp Ser Lys Lys Lys Lys Thr Ile Leu Asp Gln Ile Phe Val Trp Glu

595 600 605

Gln Asn Leu Glu Gln Phe Gln Met Asp Leu Phe Arg Phe Arg Cys Tyr

610 615 620

Leu Ala Ser Leu Gln Gly Gly Glu Leu Pro Asn Pro Lys Arg Leu Leu

625 630 635 640

Ala Phe Ala Ser Arg Pro Thr Lys Val Ala Met Gly Arg Leu Gly Ile

645 650 655

Phe Ser Val Ser Ser Phe His Ala Leu Val Ala Ala Arg Thr Gly Glu

660 665 670

Thr Gly Val Arg Arg Arg Thr Gln Ala Met Ser Arg Ser Ala Ser Lys

675 680 685

Arg Arg Ser Arg Phe Ser Ser Leu Trp Gly Leu Asp Thr Thr Ser Lys

690 695 700

Lys Lys Gln Gly Arg Pro Ser Ile Asn Gln Val Phe Gly Glu Gly Thr
705 710 715 720

Glu Ala Val Lys Lys Ser Leu Glu Gly Ile Phe Asp Asp Ile Val Pro
725 730 735

Asp Gly Lys Arg Glu Lys Glu Val Val Leu Pro Asn Val His Gln His
740 745 750

Asn Pro Asp Cys Asp Ile Trp Val His Glu Tyr Phe Thr Pro Ser Trp
755 760 765

Phe Cys Leu Pro Asn Asn Gln Pro Ala Leu Thr Val Val Arg Pro Gly
770 775 780

Asp Thr Ala Arg Asp Thr Leu Glu Leu Ile Cys Lys Thr His Gln Leu
785 790 795 800

Asp His Ser Ala His Tyr Leu Arg Leu Lys Phe Leu Ile Glu Asn Lys
805 810 815

Met Gln Leu Tyr Val Pro Gln Pro Glu Glu Asp Ile Tyr Glu Leu Leu
820 825 830

Tyr Lys Glu Ile Glu Ile Cys Pro Lys Val Thr His Ser Ile His Ile
835 840 845

Glu Lys Ser Asp Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ser
850 855 860

Val Glu Glu Asp Gly Ile Arg Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Lys Glu
865 870 875 880

Thr Gly Leu Ala Ser Lys Lys Gly Leu Lys Ala Gly Asp Glu Ile Leu
885 890 895

Glu Ile Asn Asn Arg Ala Ala Asp Ala Leu Asn Ser Ser Met Leu Lys
900 905 910

Asp Phe Leu Ser Gln Pro Ser Leu Gly Leu Leu Val Arg Thr Tyr Pro
915 920 925

Glu Leu Glu Glu Gly Val Glu Leu Leu Glu Ser Pro Pro His Arg Val
930 935 940

Asp Gly Pro Ala Asp Leu Asp Glu Ser Pro Leu Ala Phe Leu Thr Ser
945 950 955 960

Asn Pro Gly His Ser Leu Cys Ser Glu Gln Gly Ser Ser Ala Glu Thr
965 970 975

Ala Pro Glu Glu Thr Glu Gly Pro Asp Leu Glu Ser Ser Asp Glu Thr
980 985 990

Asp His Ser Ser Lys Ser Thr Glu Gln Val Ala Ala Phe Cys Arg Ser
995 1000 1005

Leu His Glu Met Asn Pro Ser Asp Gln Asn Pro Ser Pro Gln Asp Ser

1010

1015

1020

Thr Gly Pro Gln Leu Ala Thr Met Arg Gln Leu Ser Asp Ala Asp Asn

1025

1030

1035

1040

Val Arg Lys Val Ile Cys Glu Leu Leu Glu Thr Glu Arg Thr Tyr Val

1045

1050

1055

Lys Asp Leu Asn Cys Leu Met Glu Arg Tyr Leu Lys Pro Leu Gln Lys

1060

1065

1070

Glu Thr Phe Leu Thr Gln Asp Glu Leu Asp Val Leu Phe Gly Asn Leu

1075

1080

1085

Thr Glu Met Val Glu Phe Gln Val Glu Phe Leu Lys Thr Leu Glu Asp

1090

1095

1100

Gly Val Arg Leu Val Pro Asp Leu Glu Lys Leu Glu Lys Val Asp Gln

1105

1110

1115

1120

Phe Lys Lys Val Leu Phe Ser Leu Gly Gly Ser Phe Leu Tyr Tyr Ala

1125

1130

1135

Asp Arg Phe Lys Leu Tyr Ser Ala Phe Cys Ala Ile His Thr Lys Val

1140

1145

1150

Pro Lys Val Leu Val Lys Ala Lys Thr Asp Thr Ala Phe Lys Ala Phe

1155

1160

1165

Leu Asp Ala Gln Asn Pro Lys Gln Gln His Ser Ser Thr Leu Glu Ser
1170 1175 1180

Tyr Leu Ile Lys Pro Ile Gln Arg Ile Leu Lys Tyr Pro Leu Leu Leu
1185 1190 1195 1200

Arg Glu Leu Phe Ala Leu Thr Asp Ala Glu Ser Glu Glu His Tyr His
1205 1210 1215

Leu Asp Val Ala Ile Lys Thr Met Asn Lys Val Ala Ser His Ile Asn
1220 1225 1230

Glu Met Gln Lys Ile His Glu Glu Phe Gly Ala Val Phe Asp Gln Leu
1235 1240 1245

Ile Ala Glu Gln Thr Gly Glu Lys Lys Glu Val Ala Asp Leu Ser Met
1250 1255 1260

Gly Asp Leu Leu Leu His Thr Thr Val Ile Trp Leu Asn Pro Pro Ala
1265 1270 1275 1280

Ser Leu Gly Lys Trp Lys Lys Glu Pro Glu Leu Ala Ala Phe Val Phe
1285 1290 1295

Lys Thr Ala Val Val Leu Val Tyr Lys Asp Gly Ser Lys Gln Lys Lys
1300 1305 1310

Lys Leu Val Gly Ser His Arg Leu Ser Ile Tyr Glu Asp Trp Asp Pro
1315 1320 1325

Phe Arg Phe Arg His Met Ile Pro Thr Glu Ala Leu Gln Val Arg Ala
1330 1335 1340

Leu Ala Ser Ala Asp Ala Glu Ala Asn Ala Val Cys Glu Ile Val His
1345 1350 1355 1360

Val Lys Ser Glu Ser Glu Gly Arg Pro Glu Arg Val Phe His Leu Cys
1365 1370 1375

Cys Ser Ser Pro Glu Ser Arg Lys Asp Phe Leu Lys Ala Val His Ser
1380 1385 1390

Ile Leu Arg Asp Lys His Arg Arg Gln Leu Leu Lys Thr Glu Ser Leu
1395 1400 1405

Pro Ser Ser Gln Gln Tyr Val Pro Phe Gly Gly Lys Arg Leu Cys Ala
1410 1415 1420

Leu Lys Gly Ala Arg Pro Ala Met Ser Arg Ala Val Ser Ala Pro Ser
1425 1430 1435 1440

Lys Ser Leu Gly Arg Arg Arg Arg Arg Leu Ala Arg Asn Arg Phe Thr
1445 1450 1455

Ile Asp Ser Asp Ala Val Ser Ala Ser Ser Pro Glu Lys Glu Ser Gln
1460 1465 1470

Gln Pro Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asp Arg Trp Val Glu Glu Gln Phe

1475 1480 1485

Asp Leu Ala Gln Tyr Glu Glu Gln Asp Asp Ile Lys Glu Thr Asp Ile
1490 1495 1500

Leu Ser Asp Asp Asp Glu Phe Cys Glu Ser Val Lys Gly Ala Ser Val
1505 1510 1515 1520

Asp Arg Asp Leu Gln Glu Arg Leu Gln Ala Thr Ser Ile Ser Gln Arg
1525 1530 1535

Glu Arg Gly Arg Lys Thr Leu Asp Ser His Ala Ser Arg Met Ala Gln
1540 1545 1550

Leu Lys Lys Gln Ala Ala Leu Ser Gly Ile Asn Gly Gly Leu Glu Ser
1555 1560 1565

Ala Ser Glu Glu Val Ile Trp Val Arg Arg Glu Asp Phe Ala Pro Ser
1570 1575 1580

Arg Lys Leu Asn Thr Glu Ile
1585 1590

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HA-tag

<400> 7

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1

5

【図面の簡単な説明】

【図 1】

DOCK 2 がその N 末端の領域で ELMO 1 と結合することを示す図である。A は、DOCK 2 及び DOCK 2 欠失変異体の構造を模式的に示す図である。図中、黒塗りは SH3 ドメインである。

B は、293 T 細胞に DOCK 2 あるいは DOCK 2 欠失変異体をコードする遺伝子を、PcDNA ELMO1-V5 と共にトランスフェクトし、48 時間後に細胞を回収し、免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いて ELMO 1 との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

【図 2】

ELMO 1 との結合に重要な N 末端領域を欠失した DOCK 2 ΔN では Rac 活性化能が顕著に低下し、アクチン重合を誘導できないことを示す図である。

A は、BE α 16-3、N3-5、及び遺伝子導入細胞株 (17-11、84-3) における DOCK 2 あるいは DOCK 2 ΔN の発現を、DOCK 2 に対するポリクロナール抗体を用いたウェスタンブロット法にて解析した図である。図中、NS は非特異的なバンドを示す。

B は、84-3、17-11、BE α 16-3 の細胞抽出液を PAK1 Rac 結合ドメインの GST 融合タンパク質でプルダウンし、抗 Rac 抗体で染色することにより活性型 Rac を検出した図である。

C は、BE α 16-3、17-11、84-3 を propidium iodide 及びファロイジン (phalloidin) で染色することで細胞の極性化及びアクチン重合につき検討

した図である。

【図 3】

DOCK2 がその SH3 ドメインを介して ELMO1 と会合することを示す図である。

A は、DOCK2 SH3 ドメインを含む 10-89 のアミノ配列を示す図である。グルタミン酸に置換したアミノ酸残基を太字で示す。

B は、293T 細胞に DOCK2 あるいは DOCK2 SH3 変異体をコードする遺伝子を、PcDNA ELMO1-V5 と共にトランスフェクトし、48 時間後に細胞を回収し、免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いて ELMO1 との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

【図 4】

ELMO1 がその C 末端の領域で DOCK2 に結合していることを示す図である。

A は、ELMO1 及びこの実験で使用した ELMO1 欠失変異体の構造を模式的に示す図である。

B は、293T 細胞に ELMO1 及び ELMO1 欠失変異体をコードする遺伝子を、PcDNA DOCK2-HA あるいはコントロールベクターと共にトランスフェクトし、48 時間後に細胞を回収し免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いて DOCK2 との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

【図 5】

ELMO1 がその N 末端の領域で Tiam1 に結合していることを示す図である。

A は、ELMO1 及びこの実験で使用した ELMO1 欠失変異体の構造を模式的に示す図である。

B は、293T 細胞に ELMO1 及び ELMO1 欠失変異体をコードする遺伝子を、PCI Tiam1-HA あるいはコントロールベクターと共にトランスフェクトし、48 時間後に細胞を回収し免疫沈降及びウェスタンブロット法を用い

て T i a m 1 との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

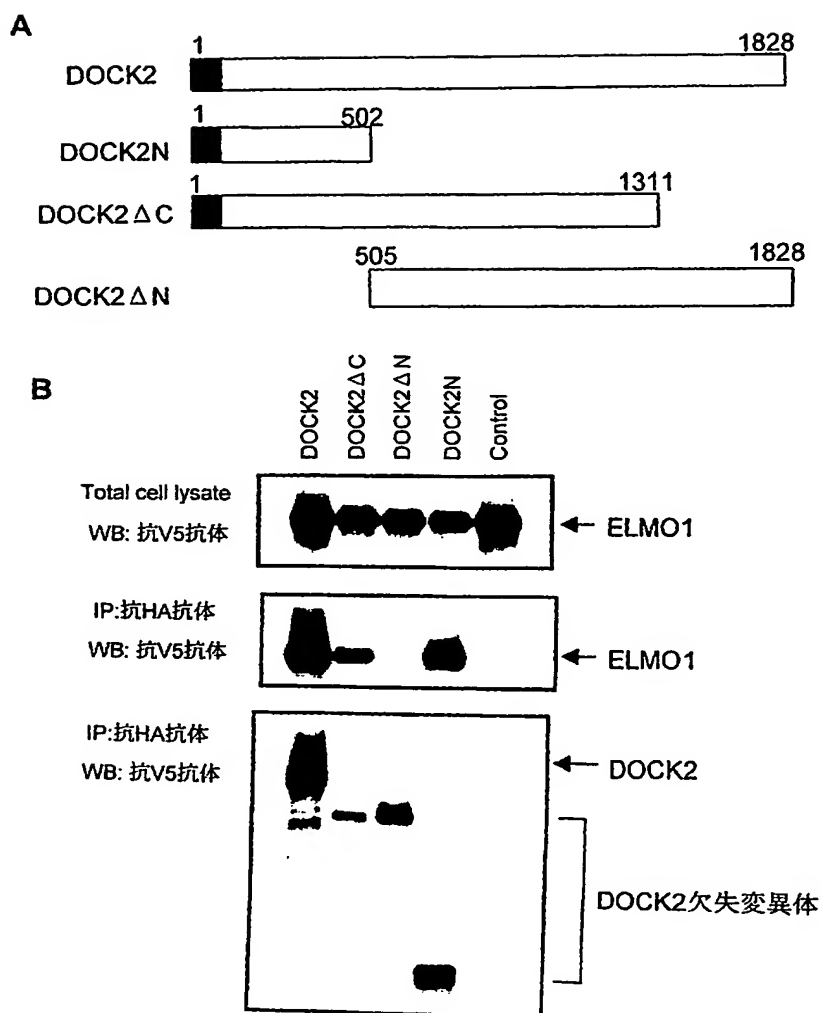
【図 6】

D O C K 2 による R a c 活性化機構の模式図である。

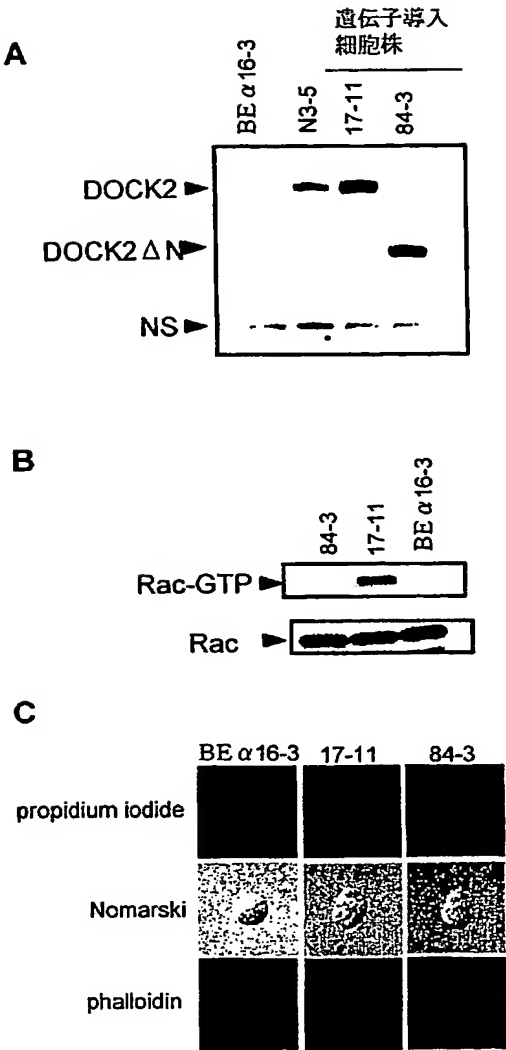
D O C K 2 は E L M O 1 を介して、R a c の G E F として機能する T i a m をリクルートすることで R a c を活性化することを示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

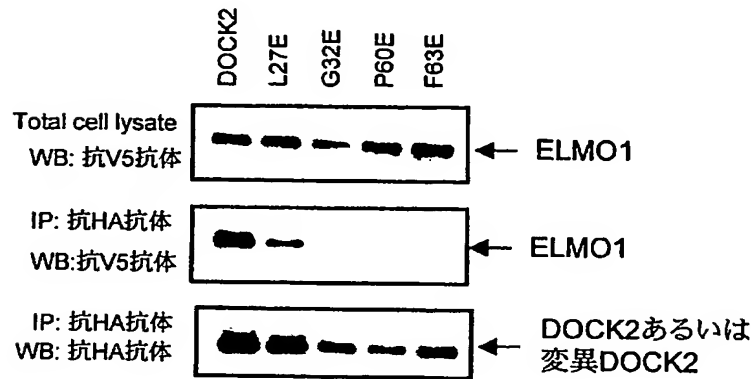


【図3】

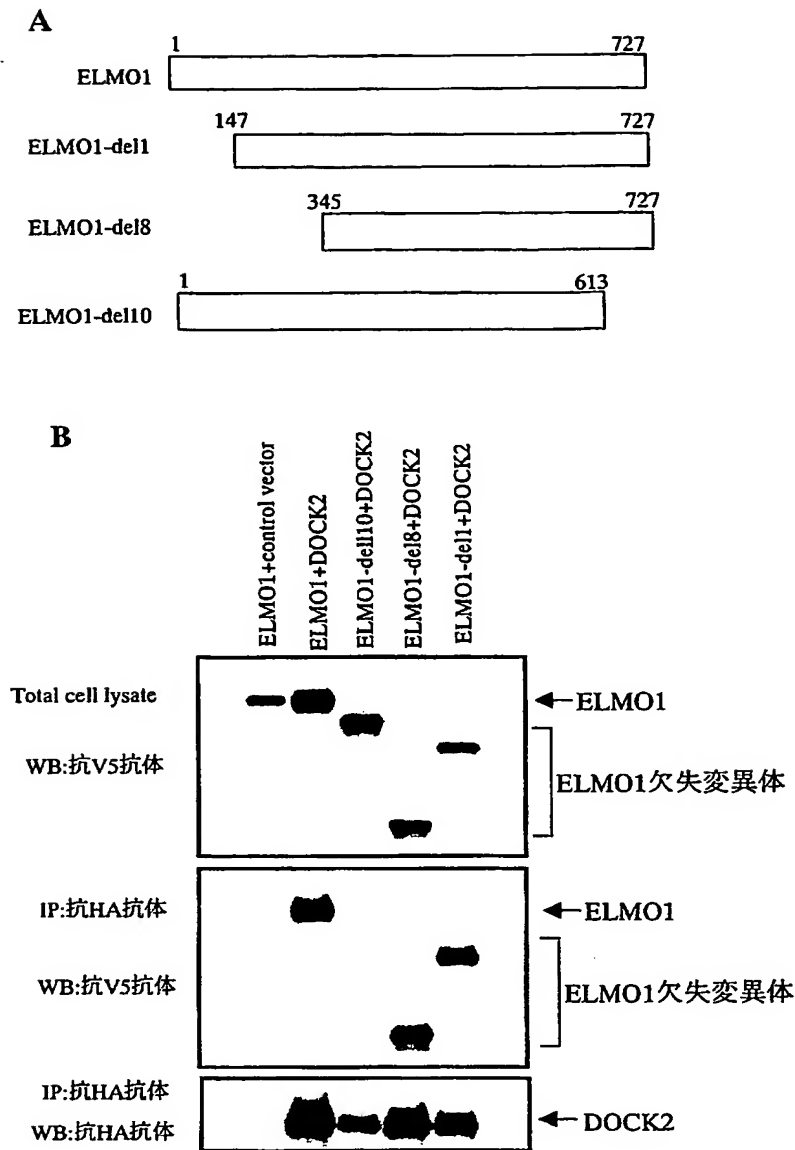
A

10 20 30 40
 ERHGVAFYNF~~GG~~SEAQH~~LT~~LQIGDVVRIQETGGDWYRGYL
 50 60 70 80
 IKHKLSQGIF~~P~~TSFIHLKEVTVEKRRNIENIPAEIPLAQ

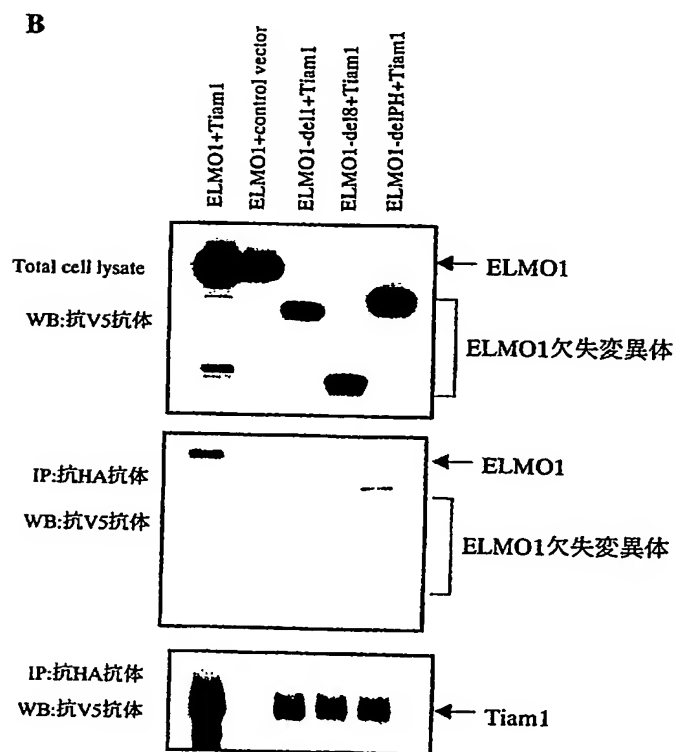
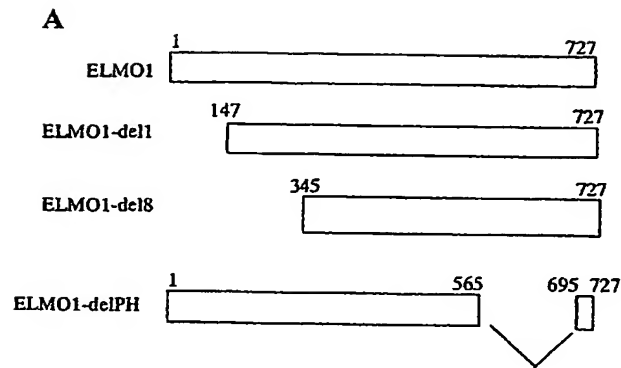
B



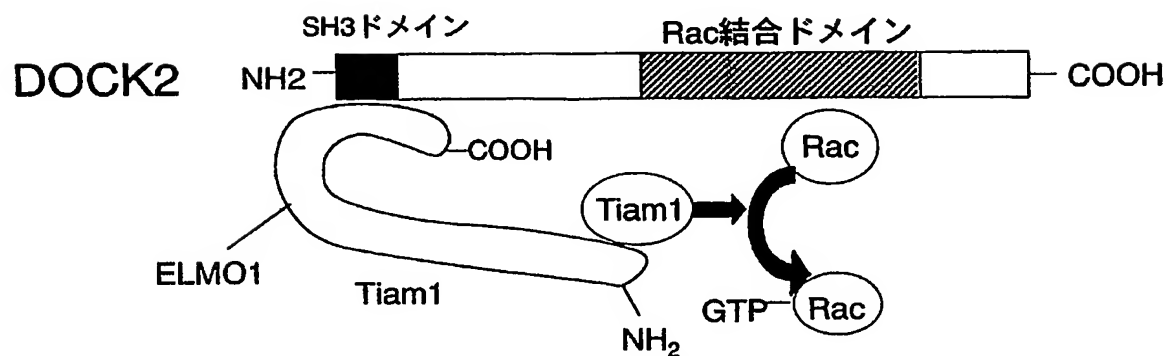
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DOCK2とELMO1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMO1とTiam1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用するアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等を提供すること。

【解決手段】 DOCK2のN末端の504アミノ酸残基を欠失したDOCK2変異体ではRac活性化能が著しく低下し、アクチン重合を惹起できないことを見い出し、この領域に結合する分子としてELMO1を同定した。DOCK2はSH3ドメインを介してELMO1に会合していることを見い出した。さらに、ELMO1が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子（GEF）として機能するTiam1と結合することを見い出した。DOCK2はELMO1を介してTiam1をリクルートすることによりRacを活性化していることを見い出した。

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2002-342683
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 2 - 3 4 2 6 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

| | |
|----------|-----------------------|
| 1. 変更年月日 | 1 9 9 8 年 2 月 2 4 日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 科学技術振興事業団 |

特願 2 0 0 2 - 3 4 2 6 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由] 新規登録

住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**